

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden

**Untersuchungen über den Einfluss
der multipel hydrophoben Proteine des Equiden Herpesvirus 1
auf die Replikation in polarisierten Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Tanja Susanne Stenke
aus Günzburg

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Angefertigt im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs
„Infektion und Immunität“
der Ludwig-Maximilians-Universität München

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Das Equide Herpesvirus 1 (EHV-1)	2
2.1.1	Die Pathogenese der EHV-1-Infektionen	2
2.1.2	Die Klassifizierung der Herpesviren	3
2.1.3	Die Morphologie der Herpesviren	3
2.1.4	Der Genomaufbau der Herpesviren	4
2.1.5	Die Replikation von EHV-1	5
2.1.6	Der "Cell-to-Cell Spread" von HSV-1	6
2.1.7	Die Genexpression von HSV-1	7
2.1.8	Die EHV-1-Proteine	8
2.1.8.1	Die Multipel Hydrophoben Transmembranproteine von EHV-1	8
2.1.8.2	Die UL43-Homologen der Herpesviren	11
2.2	Polarisierte Zellen	14
2.2.1	Allgemeines	14
2.2.2	Die interzellulären Verbindungsstrukturen polarisierter Zellen	15
2.2.3	Die Morphologie des Zytoskeletts polarisierter Zellen	17
2.2.4	Der Transport und die Sortierungsvorgänge in polarisierten Zellen	17
2.2.5	Die Infektion polarisierter Zellen	19
3.	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Versuchstiere	22
3.1.2	Zellen	22
3.1.3	Bakterien und Plasmide	22
3.1.3.1	Bakterien	22
3.1.3.2	BACs („bacterial artificial chromosomes“)	22
3.1.3.3	Plasmide	22

3.1.4	Antikörper und Antiseren	23
3.1.4.1	Monoklonale Antikörper	23
3.1.4.2	Polyklonale Antikörper	23
3.1.4.3	Direkt Fluoreszenz-markierte Antikörper	23
3.1.4.4	Mit „Alexa“ konjugierte Antikörper	24
3.1.4.5	Mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper	24
3.1.4.6	Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper	24
3.1.5	Lösungen, Puffer und Reagenzien	25
3.1.6	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	35
3.2	Methoden	37
3.2.1	Zellen	37
3.2.1.1	Zellkultur	37
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	37
3.2.1.3	Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot	37
3.2.1.4	Zellfraktionierung	38
3.2.1.5	Lipid Raft-Präparation	39
3.2.1.6	Transfektion eukaryotischer Zellen mit PerFectin™ oder Lipofectin®	39
3.2.1.7	Herstellung rekombinanter Zelllinien	39
3.2.2	Virus	40
3.2.2.1	Verwendete Virusstämme	40
3.2.2.2	Virusvermehrung in Zellkultur	40
3.2.2.3	Virustitration	41
3.2.2.4	Präparation viraler DNS	41
3.2.2.5	Aufreinigung extrazellulärer Virionen	42
3.2.3	DNS	42
3.2.3.1	Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.2.3.2	Präparation und Aufreinigung von DNS nach PCR oder Restriktionsenzymverdau	43
3.2.3.3	DNS-Konzentrationsbestimmung	43
3.2.3.4	DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	44
3.2.3.5	Ligation von DNS-Fragmenten	44
3.2.3.6	DNS-DNS-Hybridisierung (Southern Blot)	45
3.2.3.7	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS	47
3.2.3.8	Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien	47
3.2.3.9	Konservierung von Bakterien	48

3.2.4	Herstellung rekombinanter Viren	48
3.2.4.1	BAC-Mutagenese	48
3.2.4.2	Amplifizierung und Aufreinigung linearer Rekombinationssequenzen	49
3.2.4.3	Herstellung elektrokompetenter Bakterien für die Elektroporation	50
3.2.4.4	Transformation durch Elektroporation	51
3.2.4.5	Isolierung von BAC-DNS aus Bakterien	51
3.2.4.6	Eliminierung der Sequenz des Mini F Plasmids pHA2	52
3.2.5	Charakterisierung rekombinanter Viren <i>in vitro</i>	52
3.2.5.1	Einschritt-Wachstumskinetik	52
3.2.5.2	Wachstumskinetik auf polarisierten Zellen	53
3.2.5.3	Plauegrößenvergleich	54
3.2.5.4	Vergleich der Penetrationsfähigkeit	54
3.2.6	Expression und Aufreinigung des UL43-Proteins von EHV-1 in Bakterien	55
3.2.6.1	Expression	55
3.2.6.2	Aufreinigung	56
3.2.7	Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	57
3.2.8	Proteine	57
3.2.8.1	Proteinanalyse mittels Elektrophorese	57
3.2.8.1.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.2.8.1.2	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau	59
3.2.8.1.3	Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen (Western Blot)	59
3.2.8.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	60
4.	Ergebnisse	61
4.1	Die Charakterisierung des EHV-1 UL43-Produktes	61
4.1.1	Die Herstellung rekombinanter Plasmide	61
4.1.2	Die Herstellung einer UL43-exprimierenden Zelllinie	63
4.1.3	Die Charakterisierung des UL43-Proteins	64
4.1.3.1	Die Immunisierung von Kaninchen mit UL43-spezifischen Polypeptiden	64
4.1.3.2	Das GFP-UL43-Fusionsprotein (GFPC43) im Western Blot	65
4.1.3.2.1	Die Identifizierung des GFPC43	65
4.1.3.2.2	Das GFPC43 ist membranassoziiert	66
4.1.3.2.3	Das zelluläre GFPC43 wird in extrazelluläre Virionen eingebaut	67
4.1.3.2.4	Die Untersuchung einer Assoziation des GFPC43 mit Lipid Rafts	68

4.1.3.3	Das GFPC43 in der Fluoreszenz	71
4.1.3.3.1	Der Vergleich der Verteilung der GFPC43-Fluoreszenz nach Expression verschiedener Konstrukte	71
4.1.3.3.2	Der Einfluss der Zelldichte auf die Verteilung des GFPC43-Signals in TCGFPC43-Zellen	72
4.1.3.3.3	Die Kolokalisation des GFPC43 mit γ -Adaptin und β -Catenin	73
4.1.3.3.4	Die Lokalisation des GFPC43 in infizierten TCGFPC43-Zellen	75
4.1.4	Die UL43-Deletionsmutante (H Δ 43)	77
4.1.4.1	Die Konstruktion eines UL43-negativen Virus basierend auf dem Stamm Rach	77
4.1.4.2	Die Charakterisierung des Genotyps des H Δ 43	78
4.1.4.3	Die Darstellung des H Δ 43 im Western Blot	79
4.1.4.4	Die funktionelle Charakterisierung des H Δ 43 in Zellkultur	80
4.1.4.4.1	Der Plaquephänotyp des H Δ 43	80
4.1.4.4.2	Die Penetrationsfähigkeit des H Δ 43	83
4.1.4.4.3	Die Einschnitt-Wachstumskinetik des H Δ 43	83
4.2	Die polarisierten Zellen	85
4.2.1	Die vergleichende Darstellung von Rk13- und MDCK-Zellen in der IIF	85
4.2.2	Die Infektion polarisierter Zellen	87
4.2.2.1	Der Vergleich der Infizierbarkeit von Rk13- und MDCK-Zellen mittels Fluoreszenz	87
4.2.2.2	Das EHV-1-Wachstum auf polarisierten Zellen im Transwell®-Filtersystem	89
4.2.2.3	Die Infektion polarisierter Zellen mit verschiedenen EHV-1-Deletionsmutanten	94
5.	Diskussion	98
5.1	Das UL43-Protein von EHV-1	98
5.2	Funktionelle Untersuchung des UL43-Proteins	103
5.3	Polarisation und Infektion	106
6.	Zusammenfassung / Summary	112
7.	Literaturverzeichnis	116
8.	Abkürzungsverzeichnis	128

1. Einleitung

Das Equide Herpesvirus 1 (EHV-1) ist ein Mitglied der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* und ein bedeutender Infektionserreger des Pferdes. Die Infektionen verlaufen meist subklinisch, können aber auch schwerwiegende Krankheitsbilder auslösen. So kann EHV-1 Rhinopneumonitiden verursachen, spät in der Trächtigkeit Aborte induzieren oder seltener auch Myeloenzephalopathien hervorrufen.

Die Pathogenese der verschiedenen Krankheitsbilder ist noch wenig verstanden, doch scheint die Effektivität der Replikation in verschiedenen polarisierten Zellverbänden des Wirtsorganismus eine wichtige Rolle zu spielen. Schon die initiale Infektion erfolgt über das polarisierte Epithel des oberen Respirationstraktes. Im weiteren Verlauf können Lymphozyten, Endothelzellen und auch neuronale Zellen infiziert werden.

Die Auswirkung der Polarisation von Zellen auf die EHV-1-Infektion bzw. -Replikation war zu Beginn dieser Arbeit auf molekular-virologischer Ebene noch nicht untersucht. Daher sollte zunächst ein *in vitro*-Zellkulturmodell zur Analyse der EHV-1-Replikation in polarisierten Zellen etabliert und im Anschluss die Bedeutung der multipel hydrophoben Proteine des EHV-1 in diesem System untersucht werden.

Multipel hydrophobe Proteine zeichnen sich durch ihre besondere Struktur aus. Die vorliegende Arbeit basierte auf der Hypothese, dass diesen Proteinen spezielle Funktionen in der Sortierung viraler Partikel in polarisierten Zellen zuzuordnen seien. Das EHV-1-Genom kodiert für mindestens 76 Proteine, von denen vier multipel hydrophobe Sequenzen beinhalten. Drei davon, das Glykoprotein M (gM), das pUL20 und das gK, waren vor Beginn dieser Arbeit bereits identifiziert und initial charakterisiert. Es war daher bekannt, dass diese Proteine wichtige Funktionen im viralen „Egress“ und im „Cell-to-Cell Spread“ übernehmen, genauere Mechanismen waren allerdings noch nicht bestimmt. Entsprechende in diesen Proteinen mutierte Viren standen für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung.

Das Vierte, das Produkt des UL43-Gens sollte dagegen zunächst identifiziert und seine strukturellen wie funktionellen Eigenschaften bestimmt werden. Es sollten Reagenzien zur Detektion des Genproduktes und UL43-negative Viren generiert werden. Im Vergleich der Eigenschaften der Deletionsmutanten mit denen des entsprechenden Ausgangsvirus sollte die Funktion des pUL43 zunächst in herkömmlicher Zellkultur geklärt werden, bevor auch dessen Rolle bei der Replikation im polarisierten Zellverband untersucht werden sollte.

2. Schrifttum

2.1 Das Equide Herpesvirus 1 (EHV-1)

2.1.1 Die Pathogenese der EHV-1-Infektionen

Eine EHV-1-Infektion kann bei Pferden respiratorische Symptome auslösen, zu Aborten führen oder selten eine Myeloenzephalitis induzieren.

Die Infektion des Wirtes beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel an die Zellen des respiratorischen Epithels. Nach schneller intrazellulärer Lokalisation der Nukleokapside kommt es zur Replikation des Virus und zur Ausbreitung der infektiösen Nachkommenviren von Zelle zu Zelle. Nekrotische Bereiche und intranukleäre Einschlusskörperchen können als Folgeerscheinungen im respiratorischen Epithel beobachtet werden. Die primäre Ausbreitung des Virus kann beim Wirt das respiratorische Krankheitsbild mit Fieber, Anorexie und Nasenausfluss auslösen (ALLEN et al., 1999; VAN MAANEN, 2002).

Bei subepithelialer Invasion virulenter Stämme können permissive Zellen in der Lamina Propria, wie Leukozyten und Endothelzellen der lokalen Blut- und Lymphgefäße, infiziert werden. Im Anschluss kann sich die Infektion auf die Endothel- und mononukleären Zellen der regionalen Lymphknoten ausbreiten. Nach Amplifikation des Virus in den Leukozyten der Lymphknoten können infizierte Leukozyten über die Blut- und Lymphgefäße im gesamten System verbreitet werden (ALLEN et al., 1999).

Nach einer virämischen Phase kann es zur Virus-Replikation in weiteren Organsystemen kommen. Im trächtigen Uterus infizieren z. B. besonders endotheliotrope EHV-1-Stämme die Endothelzellen der endometrialen Gefäße und vermehren sich in diesen. Die dadurch verursachten Gefäßveränderungen können zu verschieden stark ausgeprägten Thrombosen im Endometrium führen. Abhängig vom Grad der Beeinträchtigung des trächtigen Uterus kann es schnell zum Abortieren kommen. Bei milden Verlaufsformen kann die Trächtigkeit bis zum Geburtstermin bestehen bleiben (ALLEN et al., 1999 ; VAN MAANEN, 2002).

Die Pathogenese der neurologischen Form der EHV-1-Infektionen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass im Zentralen Nervensystem ähnlich wie im trächtigen Uterus ebenfalls infektionsbedingte Gefäßschädigungen und Thrombosen zu Funktionsstörungen führen. Die beobachteten Symptome reichen von Ataxien bis zu schweren Paralyse (FRIDAY et al., 2000; STIERSTORFER et al., 2002; VAN MAANEN, 2002).

Charakteristisch für eine EHV-1-Infektion ist eine lebenslange Latenz, wie sie für Herpesviren im Allgemeinen typisch ist (ALLEN et al., 1999; ROIZMAN und KNIPE, 2001; VAN MAANEN, 2002). Nach der virämischen Phase persistieren die EHV-1-Genome, geschützt vor neutralisierenden Antikörpern und zytotoxischen T-Lymphozyten, v. a. in Leukozyten und wahrscheinlich den sensorischen Neuronen des Ganglion trigeminale. Durch die limitierte transkriptionale Aktivität der latenten Genome findet keine Produktion infektiöser Tochterviren statt (ALLEN et al., 1999). Das EHV-1-Genom behält aber weiterhin die Fähigkeit zur Reaktivierung, die durch Immunsuppression oder Stress ausgelöst werden kann (ALLEN et al., 1999; VAN MAANEN, 2002). Durch die Reaktivierung kommt es zur erneuten Produktion infektiöser Viren (ALLEN et al., 1999).

2.1.2 Die Klassifizierung der Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* wird in drei Subfamilien, die *Alpha*-, die *Beta*- und die *Gammaherpesvirinae* eingeteilt. Innerhalb dieser Subfamilien werden verschiedene Genera unterschieden. Für die *Alphaherpesvirinae*, die sich durch ein relativ variables Wirtsspektrum auszeichnen und sich gut in Zellkultur vermehren lassen, sind bisher vier Genera beschrieben. Zum Genus *Simplexvirus* lassen sich alle dem Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1/HHV-1) eng verwandten *Alphaherpesvirinae* zuordnen. Das Equide Herpesvirus 1 (EHV-1) ist dem Genus *Varicellovirus* mit dem Prototyp Varicella-Zoster Virus (VZV/HHV-3) untergeordnet. Weitere Vertreter dieses Genus sind u. a. das Bovine Herpesvirus 1 und 5 (BHV-1/BoHV-1 und -5) und das Pseudorabies Virus (PRV/SuHV-1) (FAUQUET et al., 2005).

2.1.3 Die Morphologie der Herpesviren

Die Viruspartikel der Herpesviren setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen (Abb. 1). Zentral liegt die doppelsträngige virale Desoxyribonukleinsäure (DNS). Sie wird vom ikosahedralen Kapsid umgeben, das aus 162 pentagonalen und hexagonalen Kapsomeren besteht und einen Durchmesser von ca. 100 nm aufweist. Um das Nukleokapsid lagert eine amorph erscheinende Proteinschicht, das Tegument. Die Virushülle besteht aus modifizierten zellulären Membranbestandteilen und viralen Proteinen, die z. T. als Protrusionen aus der Hülle herausragen (ROIZMAN und PELLETT, 2001).

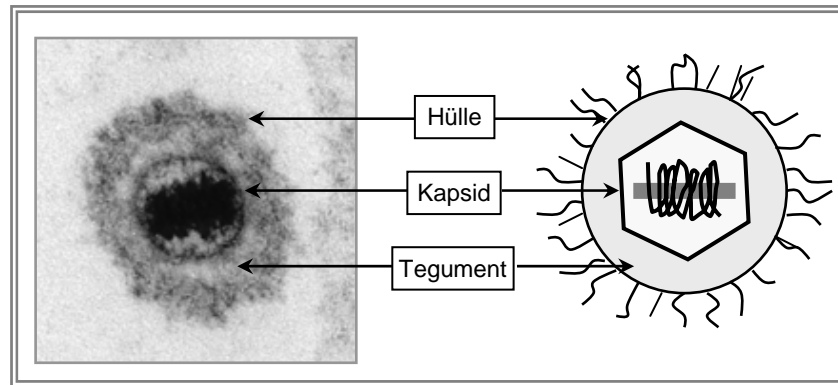


Abbildung 1: Aufbau eines Herpesviruspartikels

Der Aufbau eines EHV-1-Partikels ist anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (links) und einer schematischen Übersicht (rechts) dargestellt.

2.1.4 Der Genomaufbau der Herpesviren

Die lineare und doppelsträngige DNS umfasst je nach Herpesvirus 125 bis 240 kbp. Die Anordnung einzelner Sequenzabschnitte im Genom unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Herpesviren. Aufgrund der Lokalisation sich wiederholender Sequenzen, werden die Genomformen in sechs Gruppen von A bis F eingeteilt (ROIZMAN und PELLETT, 2001).

Die für das Genus *Varicellovirus* charakteristische Genomform der Gruppe D besteht aus einer „Unique Long“ (U_L)- und einer „Unique Short“ (U_S)-Region, die durch eine „Internal Repeat“ (IR)-Region voneinander getrennt sind. Am 3'-Ende des Genoms wiederholen sich die „Repeat“-Sequenzen in der „Terminal Repeat“ (TR)-Region (Abb. 2). Durch diese beiden „Repeat“-Regionen kann sich die Orientierung der U_S -Region relativ zur U_L -Region umkehren, so dass zwei isomere Genomformen auftreten (TELFORD et al., 1992; ROIZMAN und PELLETT, 2001).

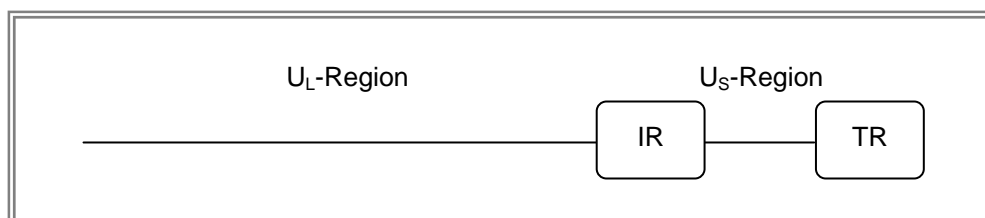


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Gruppe D-Genoms

Das Genom besteht aus einer U_L - und einer U_S -Region, die von iterativen Sequenzen (IR, TR) flankiert sind.

HSV-1 besitzt ein Genom der Gruppe E, das sich in der Zahl und der Lokalisation der „Repeat“-Regionen, sowie in der Anzahl der möglichen Isomere, von den Genomen der Gruppe D unterscheidet (ROIZMAN und PELLET, 2001).

Die einzelnen offenen Leserahmen der verschiedenen α -Herpesviren werden analog zu denen des HSV-1-Genoms bezeichnet. Diese sind aufsteigend beziffert und entsprechend der Lokalisation in einer der „Unique“-Regionen mit „UL“ oder „US“ betitelt. So ist beispielsweise das UL43-Gen der 43. Leserahmen innerhalb der U_L-Region (ROIZMAN und PELLET, 2001).

2.1.5 Die Replikation von EHV-1

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Replikationszyklen verschiedener α -Herpesviren ergaben vergleichbare Abläufe. Die Replikation beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel durch Interaktion viraler Hüllproteine und bestimmter Strukturen der Zelloberfläche (GRANZOW et al., 1997; OSTERRIEDER, 1999). Die Membranen der Viruspartikel und der Zelle verschmelzen, wodurch die Kapside mit einem Teil der Tegumentproteine ins Zytoplasma freigesetzt werden (GRANZOW et al., 1997).

Entlang der Mikrotubuli werden die Kapside zum Zellkern transportiert (SODEIK et al., 1997). Durch die Kernporen wird das Virusgenom in das Nukleoplasma entlassen und zirkularisiert sofort. Im Kern erfolgt die kaskadenartige Transkription der viralen Gene. Die Replikation der Virus-DNS folgt dabei möglicherweise dem „Rolling Circle“-Prinzip. Es entstehen konkatamere DNS-Stränge, die in die neu gebildeten Kapside eingebracht werden (GRANZOW et al., 1997; Roizman und Pellet, 2001). Nach Anlagerung von Tegumentproteinen an die DNS-haltigen Kapside assoziieren diese mit der inneren Kernmembran und gelangen als behüllte Nukleokapside in den perinukleären Raum (GRANZOW et al., 1997 und 2001).

Durch Verschmelzung der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran werden die Nukleokapside aus dem Kern freigesetzt (GRANZOW et al., 2001; RUDOLPH et al., 2002). In diesem frühen Schritt des „Egress“ spielt u. a. das EHV-1 pUL34 eine wichtige Rolle. Bei Infektion mit einem UL34-negativen EHV-1 konnten im Zytoplasma keine Nukleokapside entdeckt werden (NEUBAUER et al., 2002).

Unbehüllte herpesvirale Nukleokapside gelangen zum *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) und werden wahrscheinlich von Golgi-Membranen ein zweites Mal umhüllt (GRANZOW et al., 2001; RUDOLPH et al., 2002). Eine Störung dieser sekundären Umhüllung, beispielsweise durch Deletion von EHV-1 UL10 (gM) oder UL49,5, führt in infizierten Zellen zu einer Ansammlung unbehüllter Kapside innerhalb der TGN-Region (SEYBOLDT et al., 2000; RUDOLPH et al., 2002).

Regulär behüllte Viruspartikel werden in TGN-Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und nach Fusion von Vesikel- und Zellmembran aus der Zelle freigesetzt (GRANZOW et al., 2001; RUDOLPH et al., 2002). Beim Fehlen von bestimmten EHV-1-Proteinen, wie z. B. dem pUL20, das möglicherweise eine Re-Fusion der behüllten Viruspartikel mit den Transportvesikeln verhindert, sammeln sich unbehüllte Nukleokapside im Zytoplasma an. Extrazellulär sind dann keine Tochterviren detektierbar (GUGGEMOOS et al., im Druck). Insgesamt lassen die bisher bekannten Studien des EHV-1 ultrastrukturell viele Gemeinsamkeiten in den Abläufen des Replikationszyklus zu den anderen α -Herpesviren erkennen. Lediglich im Detail gibt es einige speziesspezifische Unterschiede, deren genaue Beschreibung den Rahmen dieser Einleitung sprengen würde.

2.1.6 Der "Cell-to-Cell Spread" von HSV-1

Da der „Cell-to-Cell Spread“, also die direkte Ausbreitung der Infektiosität von Zelle zu Zelle, ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist, wird diese Phase im Replikationszyklus hier etwas detaillierter vorgestellt. Umfassende Studien wurden bisher v. a. für HSV-1 durchgeführt.

HSV-1 kann sich relativ schnell direkt von Zelle zu Zelle ausbreiten. Dabei scheint der Glykoproteinkomplex gE/gI eine wichtige Rolle zu übernehmen. Es wurden verschiedene Modelle beschrieben, auf welche Weise gE/gI den „Cell-to-Cell Spread“ vermitteln könnte.

Der erste Ansatz schlägt eine Durchtrennung der zellulären Verbindungsstrukturen durch gE/gI vor (MAIDJI et al., 1996). Dies wird allerdings als unwahrscheinlich angesehen, da sowohl Infektionen mit Wildtyp- als auch mit gE-negativem HSV-1 keinerlei Veränderungen innerhalb der Zellverbindungsstrukturen verursachen (DINGWELL und JOHNSON, 1998).

Im zweiten Modell bindet der gE/gI-Komplex an zelluläre Liganden der Zellverbindungen und ermöglicht dadurch den Transfer von HSV-1-Partikeln in den Zwischenzellraum.

Als drittes wird dem gE/gI-Komplex eine Funktion in der Sortierung der HSV-1-Partikel zu den Zellverbindungen zugedacht. gE/gI ist Teil der Virionenhülle und könnte über seine zytoplasmatische Domäne mit der zellulären Sortierungsmaschinerie interagieren (DINGWELL und JOHNSON, 1998). Die beiden letzteren Ansätze sind auch in Kombination denkbar.

Die Glykoproteine E und I bilden nicht nur strukturell sondern auch funktionell einen Komplex (JOHNSON und FEENSTRA, 1987; DINGWELL und JOHNSON, 1998). In den zytoplasmatischen Domänen von gE/gI sind sowohl TGN- als auch endosomale Sortierungsmotive enthalten (DINGWELL und JOHNSON, 1998; WISNER et al., 2000; MCMILLAN und JOHNSON, 2001). Während der frühen Phase der Infektion akkumuliert gE/gI im TGN. Hier könnte der Komplex sowohl bei der Umhüllung der Kapside mit TGN-Membranen als auch bei der Sortierung noch unreifer Virionen nach lateral eine wichtige Rolle spielen (JOHNSON et al., 2001).

Im weiteren Verlauf der Infektion akkumuliert gE/gI zunehmend an den lateralen Zellmembranen. Dabei ähnelt das gE/gI-Verteilungsmuster dem des β -Catenin. Mögliche Liganden des Komplexes könnten folglich Komponenten der Adherens Junctions (AJ), wie Cadherine und Catenine, sein (DINGWELL und JOHNSON, 1998).

Zusätzlich zu den vorgestellten Funktionen von gE/gI spielen möglicherweise andere virale Glykoproteine, die Membranfusionen verursachen können, im „Cell-to-Cell Spread“ eine wichtige Rolle, da auch eine gesteuerte Fusion der Membranen benachbarter Zellen zu einem Transfer von Infektiosität führen könnte (SPEAR, 1993). In besonders synzytialen Virusstämmen wurden im Vergleich zu anderen Stämmen Unterschiede in vier verschiedenen Genen gefunden. Die von diesen kodierten „fusogenen“ Proteine sind pUL20, pUL24, gB und gK. Unterstützend wirken bei Fusionsereignissen die Glykoproteine D, H und L (SHIEH und SPEAR, 1994; PERTEL et al., 2001). Der „Cell-to-Cell Spread“ scheint jedoch ein sehr komplexes Geschehen zu sein, da bisher für eine große Anzahl verschiedener viraler Proteine - auch bei EHV-1 - eine Beteiligung nachgewiesen wurde (OSTERRIEDER et al., 1996; SCHIMMER und NEUBAUER, 2003; NEUBAUER et al., 2004; GUGGEMOOS et al., im Druck).

2.1.7 Die Genexpression von HSV-1

Die Transkription herpesviraler Gene ist bei HSV-1 bisher am besten untersucht und erfolgt kaskadenartig in drei aufeinanderfolgenden Phasen. So werden α -, β - und γ -Gene unterschieden, deren Transkription durch gegenseitige Wechselwirkungen reguliert wird. Die α („immediate-early“-)Gene werden zuerst transkribiert. Sie sind von der Synthese anderer viraler Proteine unabhängig und ihre Produkte regulieren die Expression nachfolgender Proteine. Ihnen schließen sich die β („early“-)Gene an, deren Transkription unabhängig von der Synthese der viralen DNS abläuft. Sie kodieren für Proteine, die beispielsweise am viralen DNS-Metabolismus beteiligt sind oder die Transkription weiterer Gene begünstigen. Die γ („late“-)Gene können relativ zu ihrer Abhängigkeit von der viralen DNS-Synthese in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Mit Beginn der viralen DNS-Synthese werden γ_1 („early-late“-)Gene in zunehmendem Maße transkribiert. Die Expression der γ_2 („true-late“-)Proteine aber ist gänzlich von der viralen DNS-Synthese abhängig (ROIZMAN und KNIPE, 2001).

2.1.8 Die EHV-1-Proteine

Das 150 kbp umfassende EHV-1-Genom kodiert für mindestens 76 virale Proteine, die teilweise bereits den Struktur- oder Nichtstrukturproteinen zugeordnet werden konnten. Während Nichtstrukturproteine v. a. regulatorische Funktionen im viralen Replikationszyklus haben, sind Strukturproteine Bestandteile der gebildeten Virionen und werden je nach Lokalisation in Kapsid-, Tegument- und Hüllproteine eingeteilt. Von besonderem Interesse waren für die vorliegende Arbeit die multipel hydrophoben Transmembranproteine des EHV-1 (TELFORD et al., 1992).

2.1.8.1 Die Multipel Hydrophoben Transmembranproteine von EHV-1

Transmembranproteine sind amphipathische Moleküle, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Domänen besitzen. Einige der hydrophoben Bereiche sind in Form von α -Helices in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingelagert. Mit ihren hydrophilen Domänen ragen sie beidseits der Membran in wässriges Milieu (COOPER, 2000).

In Abhängigkeit von Anzahl und Lokalisation der Transmembrandomänen können die multipel hydrophoben Proteine in drei Klassen eingeteilt werden. Proteine der Klasse I bestehen aus einer Transmembrandomäne und einem in den luminalen Teil des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ragenden Amino (N)-Terminus. Große Ähnlichkeit besteht zu den Klasse II-Membranproteinen, bei denen allerdings das N-terminale Ende dem Zytoplasma zugewandt ist. Polypeptide mit mehreren Transmembrandomänen finden sich in der Klasse III wieder (LEWIN, 1998). In Hydrophobizitätsplots werden aufgrund der Aminosäuresequenz hydrophile und hydrophobe Bereiche eines Polypeptids graphisch dargestellt (KYTE und DOOLITTLE, 1982), woraus eine mögliche Membranassoziation erschlossen werden kann (Abb. 3).

Bei HSV-1 sind fünf Leserahmen (UL10, UL20, UL43, UL43,5 und UL53) für multipel hydrophobe Proteine bekannt, die teilweise bereits genauer untersucht worden sind (MACLEAN et al., 1991; BAINES et al., 1991 und 1993; HUTCHINSON et al., 1992; FOSTER et al., 2003). Die EHV-1-Sequenz weist vier entsprechende homologe Leserahmen auf, deren Produkte z. T. identifiziert und charakterisiert sind (TELFORD et al., 1992).

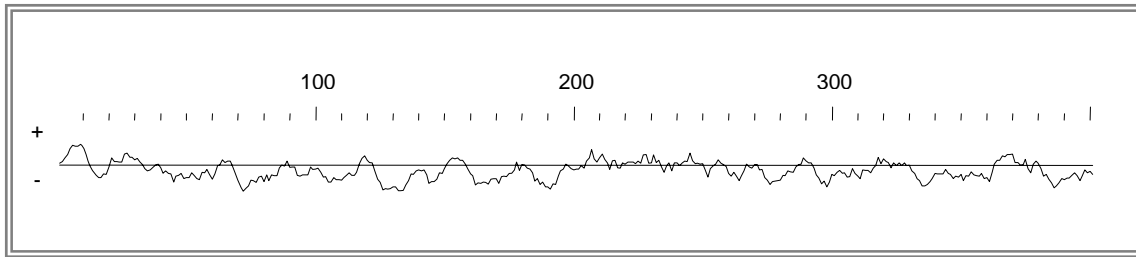


Abbildung 3: Hydrophobizitätsplot des vorhergesagten UL43-Polypeptides

Der abgebildete Hydrophobizitätsplot (Husar, GCG Softwarepackage, Heidelberg) zeigt die Zusammensetzung des UL43-Polypeptides aus verschiedenen hydrophilen (+) und hydrophoben (-) Anteilen.

Das Glykoprotein M (gM, UL10) bei EHV-1

Das vom EHV-1 UL10-Gen kodierte Glykoprotein M besteht aus 450 Aminosäuren und ist ein Klasse III-Transmembranprotein mit acht Transmembrandomänen. Es wurde als Bestandteil der Virushülle nachgewiesen (TELFORD et al., 1992; OSTERRIEDER et al., 1996; SEYBOLDT et al., 2000). Mit einem gM-spezifischen Antikörper wurden UL10-Produkte im Western Blot bei apparenten Molekulargewichten von 46 bis 48 kDa, von 50 bis 55 kDa und von 105 bis 110 kDa detektiert (OSTERRIEDER et al., 1996 und 1997). Das primäre Translationsprodukt mit einem apparenten Molekulargewicht von 44 kDa wird kotranslational N-glykosyliert. Im TGN wird das nun 46 bis 48 kDa schwere Glykoprotein weiter in die 50 bis 55 kDa-Form prozessiert. Die gM-reaktive Bande von 105 bis 110 kDa stellt möglicherweise eine dimere Form dar (OSTERRIEDER et al., 1997).

Bei Infektionsversuchen mit der Insertionsmutante L11ΔgM wurden im Gegensatz zum Wildtyp-Virus bis zu 100fach geringere Virustiter auf nicht-komplementierenden Zellen verzeichnet. Außerdem waren die Plaquedurchmesser auf die Hälfte reduziert und die Penetrationsfähigkeit verringert (OSTERRIEDER et al., 1996). In weiterführenden Untersuchungen wurde ein weiteres gM-negatives EHV-1-Virus auf Basis des KentuckyA-Stammes (KyA), dem u. a. die Leserahmen für die Glykoproteine E und I fehlen, generiert. Nach Infektion von Zellen mit dem gM-negativen KyA wurde eine Plauegrößenreduktion von ca. 80 % beobachtet. Im Elektronenmikroskop wurde in KyAΔgM-infizierten Zellen ein massiver Defekt bei der Virusfreisetzung durch Blockierung der sekundären Umhüllung im TGN festgestellt (SEYBOLDT et al., 2000).

Bei anderen Herpesviren, wie dem HSV-1, dem BHV-1, dem Epstein-Barr Virus (EBV/HHV-4), dem Humanen Cytomegalovirus (HCMV), dem Infektiösen Laryngotracheitis Virus und dem PRV, wurde zwischen gM und dem jeweiligen UL49,5-Produkt bereits eine Komplexbildung und teilweise eine mögliche funktionelle Kooperation gezeigt (JÖNS et al., 1998; LAKE et al., 1998; WU et al., 1998; MACH et al., 2000; TISCHER et al., 2002; CRUMP et al., 2004). Die Deletion des UL49,5-ORF aus dem KyA führte im Vergleich mit Wildtyp-Virus, ähnlich wie die gM-Deletion (SEYBOLDT et al., 2000), zu einer Reduktion der Plaquegröße in Zellkultur, die 37 % der Wildtyp-Plaquegröße betrug, und zu bis 190fach reduzierten Virustitern. In Abwesenheit des UL49,5-Produktes wird das EHV-1 gM nicht vollständig prozessiert.

Mit einem gM-spezifischen Antikörper wurde ein weiteres 10 kDa Polypeptid kopräzipitiert. In Immunpräzipitationen aus KyA Δ 49,5-infizierten Zellen fehlte dieses kleine Protein. Es wurde geschlossen, dass die Expression dieses als UL49,5-Produkt vermuteten Proteins und dementsprechend die Komplexierung beider Proteine für die vollständige Prozessierung des gM nötig ist (RUDOLPH et al., 2002). Wie bereits aufgeführt ist gM in die zweite und endgültige Umhüllung involviert, da diese in Abwesenheit von gM, gE und gI nicht mehr stattfinden konnte. Welchen Einfluss gM auf den „Cell-to-Cell Spread“ nimmt, konnte dagegen noch nicht geklärt werden.

Das UL20-Protein bei EHV-1

Das UL20-Protein (pUL20) ist mit vier potenziellen Transmembrandomänen ein weiteres multipel hydrophobes EHV-1-Protein.

Mit Hilfe eines UL20-spezifischen Antiserums wurden im Western Blot zwei Banden in EHV-1-infizierten Zellen, bei 25 und 75 kDa, detektiert. Außerdem wurde eine Assoziation des pUL20 mit Membranen infizierter Zellen und der Hülle extrazellulärer Virionen nachgewiesen. Nach Deletion des UL20-Leserahmens aus dem EHV-1-Stamm RacL11 wurden die Eigenschaften des rekombinanten L11 Δ 20-Virus in Zellkultur untersucht. Unter Plaqueassay-Bedingungen waren im Vergleich zum Wildtyp-Virus nur winzige Plaques zu beobachten. Die intrazellulären Titer entsprachen etwa denen des Ausgangsvirus, während im Überstand fast keine Infektiosität nachgewiesen wurde. Elektronenmikroskopisch wurden in L11 Δ 20-infizierten Zellen Ansammlungen unbehüllter Nukleokapside im Zytoplasma beobachtet. Es wurde vorgeschlagen, dass das pUL20 die sekundär behüllten Partikel in den TGN-Vesikeln vor einer Fusion mit den Vesikelmembranen bewahrt. Anders als gM spielt pUL20 keine direkte Rolle in der Virus-Penetration, beeinflusst aber die Ausprägung von Synzytien und die Effektivität des „Cell-to-Cell Spreads“ entscheidend.

pUL20 interagiert physikalisch und funktionell mit einem weiteren multipel hydrophoben Protein des EHV-1, dem UL53-kodierten Glykoprotein K. Die beiden Proteine bilden ein relativ stabiles Hetero-Oligomer mit einem apparenten Molekulargewicht von 75 kDa, das unter bestimmten Bedingungen im Western Blot nachweisbar ist. Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde gezeigt, dass pUL20 in pUL20-exprimierenden Zellen diffus granulär im Zytoplasma verteilt vorliegt. Erst nach Ko-Expression mit gK wird pUL20 im TGN vorgefunden und umgekehrt (GUGGEMOOS et al., im Druck).

Das Glykoprotein K (gK, UL53) bei EHV-1

Da keine Antikörper gegen EHV-1 gK zur Verfügung stehen, wurde bisher nur ein gK-Green Fluorescent Protein (GFP)-Fusionsprotein strukturell untersucht. Dieses wird als γ_1 -Gen exprimiert, in extrazelluläre Virionen inkorporiert und liegt mit Membranen assoziiert vor. Für seine vollständige Glykosylierung benötigt EHV-1 gK den bereits erwähnten Komplexpartner pUL20. Ein gK-negatives Virus wurde durch Deletion von 88 % des UL53-Leserahmens generiert. Infektionsversuche zeigten einen signifikanten Abfall in der Produktion infektiöser Viren im Vergleich zum Wildtyp-Virus. Ein deutlicher Plaquephänotyp, eine verminderte Fähigkeit zur Synzytienbildung und eine um bis zu 40 % reduzierte Penetrationsfähigkeit sind weitere Charakteristika der gK-negativen Viren (NEUBAUER et al., 2004). Aktuell ist es schwierig genau festzulegen, welche der beschriebenen Funktionen dem pUL20, dem gK oder dem Komplex aus beiden zuzuschreiben sind.

2.1.8.2 Die UL43-Homologen der Herpesviren

Das UL43-Gen und seine Genprodukte sind durch die Subfamilien der *Alpha*- und der *Gammaherpesvirinae* konserviert. Zu Beginn dieser Arbeit lagen noch keinerlei Informationen über das UL43-Homologe des EHV-1 vor. Initiale Daten über die UL43-Proteine von HSV-1, PRV und EBV standen jedoch zur Verfügung. Für HSV-1 wurde zusätzlich ein in Gegenrichtung verlaufender Leserahmen zu UL43 gefunden und als UL43,5 bezeichnet. Ein entsprechender Leserahmen für EHV-1 ist nicht bekannt (MODROW et al., 1992; POWERS et al., 1994; CARTER et al., 1996; WARD et al., 1996).

HSV-1

Das HSV-1 UL43 wird früh im Replikationszyklus als β -Gen transkribiert. Mittels Epitop-Markierung und Generierung eines rekombinanten Virus konnte das markierte UL43-Produkt im Western Blot untersucht werden (LIU und ROIZMAN, 1991). Das UL43-Fusionsprotein wurde bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 32 kDa identifiziert. Unter Abzug von 2 kDa der angefügten Sequenz, ist das UL43-Produkt bei ca. 30 kDa einzuordnen; 10 bis 15 kDa geringer als es die Aminosäure-Sequenz vorgibt (CARTER et al., 1996). pUL43 stellt ein extrem hydrophobes membranassoziertes Protein dar, mit sechs bis sieben potentiellen Transmembrandomänen, einem mittigen und einem N-terminalen hydrophilen Bereich (MACLEAN et al., 1991).

Eine UL43-negative HSV-1-Mutante erzielt auf verschiedenen Zelllinien und bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen dieselben Endtiter und im Verlauf ähnliche Wachstumskurven wie das Wildtyp-Virus (MACLEAN et al., 1991). Auch wurde kein Einfluss der UL43-Deletion auf die Ausprägung eines synzytialen Phänotyps festgestellt (DAVIS-POYNTER et al., 1994).

In Infektionsversuchen von Mäusen hat die UL43-Deletion keine Auswirkungen auf die Fähigkeiten von HSV-1 zur Invasion und zur Ausbreitung in neuronalem Gewebe (MACLEAN et al., 1991). Die eigentliche Funktion des HSV-1 UL43 ist also letztendlich noch vollkommen unklar.

Die Aminosäuresequenzanalyse für pUL43,5 lässt ein stark hydrophiles Protein erahnen, das mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa identifiziert wurde (WARD et al., 1996). Während der Transkription des UL43,5-Gens wurde eine Abnahme der UL43-Transkription beobachtet (RAJCANI et al., 2004). In infizierten Zellen ist das UL43,5-Produkt peripher im Kern zu finden und liegt dort kolokalisiert mit dem Hauptkapsidprotein und anderen Kapsidstrukturproteinen vor. In Virionen wurde es nicht detektiert (WARD et al., 1996). Die genaue Bedeutung des pUL43,5 konnte ebenfalls noch nicht geklärt werden.

PRV

Der UL43-Leserahmen von PRV kodiert für ein aus 373 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das als β -Gen transkribiert wird (POWERS et al., 1994). Es ist ein Klasse III-Membranprotein mit bis zu neun möglichen hydrophoben Transmembrandomänen. Mit Hilfe eines UL43-spezifischen Antikörpers wurde es im Western Blot als 34 kDa-Protein in infizierten Zellen und extrazellulären Virionen detektiert. Intrazellulär lokalisiert es in zytoplasmatischen Vesikeln und kolokalisiert mit dem viralen Glykoprotein B (KLUPP et al., 2005), das wiederum eine wichtige Rolle bei der Fusion mit zellulären Membranen spielt (SPEAR und LONGNECKER, 2003).

In einem Membranfusionstest wurden die Auswirkungen des UL43-Proteins auf die Synzytienbildung nach Transfektion untersucht. Es wurde gezeigt, dass pUL43 die überschießenden Membranfusionen dieses Testsystems zu verhindern vermag. Ähnliche Beobachtungen wurden für die anderen multipel hydrophoben Proteine, gM und den gK-pUL20-Komplex, sowohl bei PRV als auch bei HSV-1 gemacht (DIETZ et al., 2000; KLUPP et al., 2000; AVITABILE et al., 2004; CRUMP et al., 2004). Dies könnte auf verwandte Rollen der multipel hydrophoben Membranproteine bei der Modulation von Fusionsprozessen während der Infektion hinweisen (KLUPP et al., 2005).

Auch die PRV-UL43-Deletionsmutanten sind in Zellkultur nahezu ungestört vermehrungsfähig (POWERS et al., 1994; KLUPP et al., 2005).

Zusammengenommen weiß man, dass pUL43 bei PRV eine scheinbar redundante Rolle in der Modulation von Membranfusionsprozessen spielt. Wo in der Replikation oder der Pathogenese diese Eigenschaft eine Rolle spielen könnte, ist aber nach wie vor ungeklärt.

EBV

Der UL43-homologe Leserahmen wird bei EBV mit BMRF2 bezeichnet. Mit einem spezifischen Antiserum wurde das BMRF2-Produkt bei einem apparenten Molekulargewicht von 53 bis 55 kDa detektiert. Es liegt mit intrazellulären Membranen assoziiert vor (MODROW et al., 1992). Durch ein Arginin-Glycin-Aspartinsäure-Muster des BMRF2-kodierten Polypeptids, das den UL43-Homologen der α -Herpesviren fehlt, könnte es als Ligand für einen zellulären Integrin-Rezeptor dienen. Deshalb wurde eine mögliche Lokalisation in der Virionenhülle und damit eine Funktion bei der Infektion epithelialer Zellen von basolateral vermutet (TUGIZOV et al., 2003; JOHANNSEN et al., 2004).

2.2 Polarisierte Zellen

2.2.1 Allgemeines

Grenzen zwischen biologischen Kompartimenten, wie z. B. zwischen Organismen und ihrer Umwelt oder zwischen Organlumen und angrenzendem Gewebe, werden *in vivo* durch polarisierte Zellen geschaffen und aufrechterhalten. In dieser Position sind ihre Aufgaben vielfältig. Durch kontrollierten und gerichteten Transport von Ionen und Lösungen durch den Zellverband wird beispielsweise die Regulierung der Homöostase gewährleistet.

Ihr intrazellulärer Aufbau unterscheidet sich in der Lokalisation der einzelnen Zellkompartimente zu nicht-polarisierten Zellen. Auch die Zelloberfläche ist charakteristisch aufgebaut. Durch eine asymmetrische Verteilung der Membranproteine entstehen apikal und basolateral sowohl strukturell als auch funktionell verschiedene Membrandomänen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Rezeptoren, Ionentransportern und -kanälen, Signaltransduktionsproteinen und zytoskeletalen Elementen (SIMONS und FULLER, 1985; YEAMAN et al., 1999; MOSTOV et al., 2003).

Die Entwicklung polarisierter Zellverbände durchläuft mehrere Phasen. Adhäsionsrezeptoren wie beispielsweise Cadherin/Catenin-Komplexe oder Integrine werden bei Zell-Zell-Kontakt aktiv. Sie leiten die Segregation der Membranproteine zur Ausbildung molekular und strukturell verschiedener Membrandomänen ein. Entlang der Plasmamembran gelangen alle räumlichen Informationen ins Zellinnere und verursachen eine Veränderung in der Verteilung und Organisation von Aktinfilamenten und Mikrotubuli und eine Umorientierung des sekretorischen Apparates entlang der zellulären Polaritätsachse. Gebildete Plasmamembranproteine werden nun gerichtet vom TGN in bestimmte Transportvesikel verpackt und zu den verschiedenen „Targeting Patches“ der einzelnen Membrandomänen entsandt (YEAMAN et al., 1999).

Für Arbeiten in Zellkultur sind verschiedene Linien polarisierter Zellen etabliert. Am besten charakterisiert sind Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen, die alle Fähigkeiten eines funktionierenden Epithels aufweisen (RODRIGUEZ et al., 1991; IKONEN et al., 1998; APODACA et al., 2001; ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zelllinie für Vergleichszwecke genutzt.

2.2.2 Die interzellulären Verbindungsstrukturen polarisierter Zellen

Nach initialem Zell-Zell-Kontakt werden zwischen benachbarten Zellen Strukturen ausgebildet, die eine Stabilisierung der interzellulären Verbindung gewährleisten (Abb. 4). Im Wesentlichen werden drei Gruppen solcher Verbindungsstrukturen mit jeweils eigenen Funktionen unterschieden.

Die Tight Junctions (TJ)

TJ bestehen aus anastomosierenden Strängen membraneigener Proteine und Lipide, die den gesamten apikalen Bereich polarisierter Zellen umspannen. Durch die Verschmelzung der äußeren Plasmamembrananteile benachbarter Zellen bilden die TJ eine Permeabilitätsbarriere, die eine Vermischung apikaler und basolateraler Membranproteine und -lipide innerhalb der Membrandoppelschicht verhindert. Sie versiegeln den Zwischenzellraum, um einen kontrollierten parazellulären Transport zu gewährleisten (CEREJIDO et al., 1998; YEAMAN et al., 1999; ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2002; HARHAJ et al., 2004).

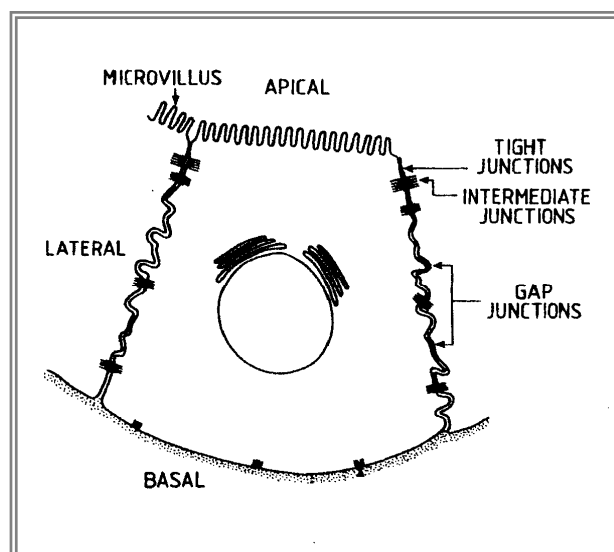


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer polarisierten Zelle

Die Übersicht zeigt die verschiedenen Plasmamembrandomänen und Verbindungsstrukturen zwischen polarisierten Zellen, dabei sind hier Adherens Junctions als „Intermediate Junctions“ bezeichnet (verändert aus SIMONS und FULLER, 1985).

Es sind drei Arten von Transmembranproteinen bekannt, die Hauptbestandteile der TJ sind. Zu ihnen gehören Occludin, Claudin und die sogenannten „Junctional Adhesion Molecules“ (JAM), die jede für sich eine eigene Familie aus multiplen Isoformen darstellen (ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2002; HARHAJ et al., 2004).

Occludin kann v. a. an TJ endothelialer und epithelialer Zellen gefunden werden und unterstützt dort als „Schlüsselprotein“ den Erhalt eines integeren Zellverbandes. Über die Carboxy (C)-terminale, zytoplasmatische Domäne ist es mit dem TJ-Protein „zonula occludens-1“ (ZO-1) (s. unten) und dem Actin-Zytoskelett verbunden, während die extrazellulären Bereiche eine Verbindung zur Nachbarzelle vermitteln und eine bedeutende Rolle in der Selektivität der parazellulären Permeabilität spielen (YEAMAN et al., 1999; HARHAJ et al., 2004).

Claudin gilt als Regulator-Protein für die Formierung der TJ. Zusammen mit den JAM reguliert es zudem die Permeabilität und Barrierenfunktionalität der TJ (HARHAJ et al., 2004). Weitere Proteine, wie die ZO-Proteine (ZO-1, -2 und -3), die zur Familie der membran-assoziierten Guanylatkinase-Homologen gehören, assoziieren mit den TJ (HASKINS et al., 1998). ZO-1 ist ein peripheres Membranprotein, das v. a. an den TJ epithelialer und endothelialer Zellen zu finden ist und zusammen mit ZO-2 und ZO-3 einen stabilen Komplex bildet (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2000). Durch multiple Protein-Bindungsdomänen, von denen u. a. eine an Occludin und eine andere am Actin-Zytoskelett bindet (FURUSE et al., 1994), interagiert es mit einer Vielzahl zellulärer Proteine (HARHAJ et al., 2004) und trägt so zur Feinmodellierung der TJ-Struktur bei (FANNING et al., 1999).

Die Adherens Junctions (AJ)

AJ werden durch Actin- und Intermediärfilamente, die der Ca^{2+} -abhängigen Cadherin-Superfamilie angehören, gebildet und treten als Umgürtelung von Zellen basolateral zu den TJ in epithelialem Gewebe (FARQUHAR und PALADE, 1963) oder als Fokalkontakte in nicht-epithelialem Gewebe in Erscheinung (ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2002). Die Cadherine bilden große Komplexe mit verschiedenen Bindungspartnern (GOODING et al., 2004). Submembranal sind die AJ u. a. mit β -Catenin verbunden, das ein wichtiger zytoplasmatischer Partner der Cadherine ist (ABERLE et al., 1996; BEN-ZE'EV et al., 2000; SHAPIRO, 2001). Zusammen mit α -Actinin, α -Catenin und Vinculin stellt β -Catenin die Verankerung des Actin-Zytoskeletts an die AJ her (SHAPIRO, 2001; KLYMKOWSKY, 2005).

Die Gap Junctions

Weitere Vertreter zellulärer Verbindungsstrukturen im polarisierten Zellverband sind kommunizierende Verbindungen, die Gap Junctions, die eine Verbindung zwischen Zytosolen benachbarter Zellen basolateral der AJ schaffen. Sie bilden Halbkanalstrukturen (Konnexone) und ermöglichen so den ungehinderten Transport von Ionen und kleinen Molekülen von Zelle zu Zelle (KOJIMA et al., 2002).

2.2.3 Die Morphologie des Zytoskeletts polarisierter Zellen

Zu den allgemeinen Aufgaben des Zytoskeletts zählen die Gewährleistung der zellulären Beweglichkeit, die Erhaltung der Zellgestalt sowie das Mitwirken bei der Mitose, der Endozytose und der Sekretion. Mit Polarisation einer Zelle entstehen neue Aufgaben, die mit Hilfe des Zytoskeletts bewältigt werden. Zu diesen zählen u. a. die effiziente Sortierung neu synthetisierter Proteine und Lipide und die Transzytose (YEAMAN et al., 1999; APODACA, 2001).

Mikrotubuli, die in nicht-polarisierten Zellen vom Nukleus in Richtung Plasmamembran ziehen, orientieren sich nach Ausbildung der Zellpolarität in langen filamentösen Bündeln entlang der apikobasalen Achse und unterstützen so die zytoplasmatische Reorganisation des sekretorischen Apparates (YEAMAN et al., 1999; APODACA, 2001).

Die Reorganisation von Actinfilamenten führt über eine Bündelung zur Entstehung der apikalen Mikrovilli. Actinfilamente innerhalb der Zelle wirken regulatorisch auf die Endozytose, die Phagozytose und die Aufnahme von Caveolae (YEAMAN et al., 1999; APODACA, 2001).

2.2.4 Der Transport und die Sortierungsvorgänge in polarisierten Zellen

Um einen polarisierten Zellaufbau zu erhalten, müssen neu synthetisierte oder endozytierte Moleküle innerhalb der Zelle sortiert und gerichtet zu ihren Zielorten gebracht werden. Hierbei kann zwischen einem direkten und einem indirekten Transfer unterschieden werden. Der direkte Weg führt vom ER über das TGN in Vesikel, die das Transportgut direkt zum Zielort bringen. Beim indirekten Weg gelangen die Vesikel an eine der beiden Plasmamembrandomänen, bevorzugt an die basolaterale, fusionieren mit dieser und entlassen ihre Fracht nach außen. Diese wird an der gleichen Zellmembran wieder endozytiert und schließlich in Endosomen nach apikal transzytiert. Der gewählte Transferweg ist stets abhängig vom Molekül selbst, von der Zellart und auch vom Stadium der Zellpolarisation (WEIMBS et al., 1997; MOSTOV et al., 2000 und 2003).

Der Transport synthetisierter Proteine und Lipide

Die Zielinformationen der gebildeten Proteine sind in ihrer Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur oder in den mit ihnen interagierenden Proteinen verankert.

Für die apikale Sortierung neu synthetisierter Polypeptide, sind verschiedene sogenannte aktive Signale bekannt. Zu ihnen zählt u. a. die Assoziation mit Lipid Rafts, die als Modellbeispiel für die apikale Sortierung gilt. Die zu transportierenden Proteine besitzen dabei Glykosylphosphatidylinositol-Lipid-Anker oder bestimmte Transmembransegmente, durch die sie mit den Lipid Rafts assoziieren. Im biosynthetischen Transferweg lagern sich die glykosphingolipid- und cholesterolreichen Domänen der Lipid Rafts in den TGN-Membranen ein. Die gebildeten Cluster werden in Vesikeln nach apikal transportiert (CEREJIDO et al., 1998; IKONEN et al., 1998; YEAMAN et al., 1999; MOSTOV et al., 2000 und 2003).

Natürlich ist auch ein Lipid Raft-unabhängiger apikaler Transport möglich, der sich anderer Signale und Mechanismen bedient (WEIMBS et al., 1997; IKONEN et al., 1998; YEAMAN et al., 1999; MOSTOV et al., 2000 und 2003).

Zur basolateral gerichteten Sortierung tragen u. a. Tyrosin- oder Di-Leucin-Motive in der zytoplasmatischen Domäne der gebildeten Proteine bei. Diese Signalsequenzen werden von Clathrin-Adaptor-Hüllproteinen erkannt und die Proteine in Transportvesikel gepackt. Alternative Clathrin-unabhängige basolaterale Proteintransfers werden u. a. durch Carbohydrat-Motive vermittelt (CEREJIDO et al., 1998; IKONEN et al., 1998; YEAMAN et al., 1999; MOSTOV et al., 2000 und 2003; FÖLSCH et al., 2005).

Die entlang der Polarisationsachse ausgerichteten Mikrotubuli erleichtern den Transport über größere Strecken und dienen als Leitschienen für die vom TGN abgeschnürten Vesikel zur Zielmembran hin. Interaktionen mit dem subkortikalen Actin-Zytoskelett lenken die Vesikel in der finalen Etappe zu ihrer Adressmembran hin (WEIMBS et al., 1997; YEAMAN et al., 1999; MOSTOV et al., 2000 und 2003).

„Targeting Patches“ in der Plasmamembran ermöglichen das korrekte Andocken und die anschließende Fusion der Vesikel- mit der Zellmembran, damit neu synthetisierte oder wiederverwertete Membranproteine und -lipide in ihrer spezifischen Plasmamembrandomäne korrekt platziert werden können. Viele dieser Andockstellen besitzen ihnen verwandte Partner in den Vesikelmembranen, um eine korrekte Paarung zu gewährleisten (WEIMBS et al., 1997; YEAMAN et al., 1999; MOSTOV et al., 2000 und 2003; HARHAJ et al., 2004).

Der Transport endozytierter Moleküle

Die Endozytose reguliert und unterstützt die Funktionen der Zelle und kann modulierend auf die Polarisierung wirken. So ist z. B. bei konfluenten Zellen im Gegensatz zu nicht-konfluenten eine verminderte Endozytose von E-Cadherin zu beobachten, damit Zell-Zell-Interaktionen über AJ stabilisiert werden. Die am besten geklärte Form der Endozytose beruht auf der Bildung von Vesikeln mit Hilfe von Clathrin-Adaptor-Hüllproteinen. Andere Möglichkeiten zur Endozytose sind Clathrin-unabhängig und können z. B. durch Caveolae vermittelt werden (APODACA et al., 2001; HARHAJ et al., 2004).

Endozytiertes Material kann in Endosomen sowohl recycled als auch zur gegenüberliegenden Zellseite hin transzytiert oder in Lysosomen degradiert werden. Hierdurch wird u. a. die Wiederverwertung zelleigener Rezeptoren nach Ligandenabspaltung ermöglicht (SHEFF et al., 1999; MOSTOV et al., 2000 und 2003; HARHAJ et al., 2004).

Die endosomale Sortierung ist der des TGN sehr ähnlich und ermöglicht ebenfalls eine korrekte Adressierung der aufgenommenen Membranbestandteile mit Hilfe von Sortierungssignalen (SHEFF et al., 1999).

2.2.5 Die Infektion polarisierter Zellen

Polarisierte Zellen, wie die des Atmungs- oder Gastrointestinaltraktes, sind oft die erste Barriere und Angriffsfläche beim Eintritt eines Virus in den Wirtsorganismus. So nutzt auch EHV-1 die Schleimhaut des Respirationstraktes als Eintrittspforte. Die polarisierte Verteilung von Plasmamembranproteinen, die als Virusrezeptoren bei der Adsorption und der Penetration fungieren, und die gerichtete Sortierung innerhalb der Zelle sind wichtige Faktoren, die Viren bei ihrer Vermehrung und Ausbreitung nutzen (BASAK et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1991; TUCKER et al., 1993; ROSSEN et al., 1995).

Das Poliovirus, das Humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1), das Rifttalfieber-Virus (RVFV) und die Influenza-Viren binden wenig selektiv an beiden Membrandomänen polarisierter Zellen (TUCKER et al., 1993; GERRARD et al., 2002; BARMAN et al., 2003). Eine Präferenz für die basolaterale Zellseite zeigen dagegen das Vaccinia-Virus, das Vesikuläre Stomatitis-Virus und das Canine Parvovirus (BASAK et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1991).

Innerhalb der Zelle nutzen Viruspartikel zelluläre Transportwege, um an den Ort ihrer Replikation zu gelangen. Ebenso können neu gebildete Partikel vom TGN in zellulären sekretorischen Vesikeln, durch Sortierungssignale vermittelt, gezielt transportiert werden (ROSSEN et al., 1995; GERRARD et al., 2002). Bei mit Vaccinia-Virus, HCMV oder RVFV infizierten Zellen kommt es zu einer Zerstörung des mikrotubulären Netzwerks, was möglicherweise eine freie und ungehinderte Bewegung der virusbeladenen Vesikel zur Zellperipherie begünstigt (FISH et al., 1996; PLOUBIDOU et al., 2000; GERRARD et al., 2002).

Ähnlich wie bei der Anheftung an eine polarisierte Zelle kann auch die Freisetzung infektiöser Nachkommen-Viren über eine spezielle Plasmamembrandomäne determiniert sein. Hierbei können virale Glykoproteine, die ihrerseits durch apikale oder basolaterale Sortierungssignale an einer bestimmten Plasmamembrandomäne akkumulieren, als Marker für die Seite der Freisetzung dienen (GERRARD et al., 2002; BARMAN et al., 2003). Beim Vesikulären Stomatitis-Virus dagegen ist die basolaterale Freisetzung komplett unabhängig von der ebenfalls basolateralen Akkumulation viraler Glykoproteine (ZIMMER et al., 2002). Virale Glykoproteine können auch willkürlich in der Zellmembran verteilt werden und korrelieren nicht immer mit dem gezielten Austrittslokus (BARMAN et al., 2003). Zusätzliche andere zelluläre oder virale Faktoren sind dann entscheidend. Für das RVFV konnte eine Ausschleusung nach apikal nachgewiesen werden (GERRARD et al., 2002), während z. B. Coronaviren typabhängig nach jeweils einer Seite entlassen werden können (ROSSEN et al., 1995). Die Ausschleusung nach basolateral ermöglicht dem Virus eine weitere Ausbreitung im Wirtsorganismus über das angrenzende Gewebe und das Blut- und Lymphsystem. Die apikale Freisetzung kann dagegen in einer weiteren lokalen Virusausbreitung mit möglicher Infektion neuer Wirte resultieren. Interessanterweise muss man für EHV-1-Infektionen annehmen, dass abhängig vom Infektionsstadium und evtl. vom Virusstamm beide Richtungen der Freisetzung im respiratorischen Epithel möglich sind.

Bei HIV-1, das CD4⁺ T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen infiziert, stellt ein transienter Kontakt zwischen diesen Zellen das polarisierte Moment dar. Während eines solchen Zell-Zell-Kontaktes kommt es zu einem gerichteten Übertritt infektiöser Viruspartikel in die nicht-infizierten Zellen (JOHNSON und HUBER, 2002).

Die Infektion polarisierter Zellen mit HSV-1

α -Herpesviren sind relativ zellassoziiert und replizieren bevorzugt in polarisierten Zellen, wie Epithelzellen und Neuronen. Im Laufe der Infektion treffen HSV-1-Partikel auf beide Zelloberflächendomänen; auf die apikale Plasmamembran der epithelialen Zellen und der peripheren Enden sensorischer Neurone und nach der Reaktivierung auf die basolaterale Membran epithelialer Zellen (TRAN et al., 2000).

Bei der initialen Infektion kommt es jedoch fast ausschließlich zum Kontakt mit der apikalen Plasmamembran dichter Zellverbände. Mit Hilfe der viralen Hüll-Glykoproteine B und C kann HSV-1 bei der Adsorption mit Heparan-Sulfat-Molekülen auf der Zelle interagieren (SEARS et al., 1991; SPEAR et al., 2000). Untersuchungen mit gC-negativen HSV-1-Mutanten wiesen zudem auf eine gC-unabhängige Adsorption an basolateralen Membranen hin (SEARS et al., 1991; TRAN et al., 2000). Durch Infektionsversuche mit der polarisierten Zelllinie MDCK konnte eine deutliche Präferenz von HSV-1 für die basolaterale Zellseite beobachtet werden (HAYASHI et al., 1995; SCHELHAAS et al., 2003; MAROZIN et al., 2004). Es wird angenommen, dass die Ursache dieser Präferenz darin begründet liegt, dass der Mannose-6 Phosphat/Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor II-Rezeptor bei MDCK-Zellen nur basolateral vorhanden ist (PRYDZ et al., 1990). Menschliche Retinalpigment Epithel-Zellen, die diesen Rezeptor auf ihrer gesamten Zelloberfläche tragen, sind beidseitig mit HSV-1 infizierbar (TOPP et al., 1997).

Nach der Bindung von gD an seine verschiedenen Ko-Rezeptoren fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran und die Nukleokapside werden ins Zellinnere entlassen (GERAGHTY et al., 1998). Die eigentliche Fusion wird durch die Glykoproteine B, H und L vermittelt (SPEAR et al., 2000; SCHELHAAS et al., 2003; MAROZIN et al., 2004).

Aufgrund ihrer Größe können die Kapside nicht durch Diffusion zum Zellkern gelangen, sondern bedienen sich des zelleigenen mikrotubulären Transportweges (SODEIK et al., 1997 ; MABIT et al., 2002).

Nach Zusammenbau der Tochter-Nukleokapside im Zellkern werden diese im TGN umhüllt und in Transportvesikel verpackt, um zielgerichtet entlang der Mikrotubuli transferiert zu werden (GRANZOW et al., 2001; JOHNSON und HUBER, 2002).

Die anschließenden Vorgänge in mit α -Herpesviren infizierten polarisierten Zellen sind noch sehr wenig untersucht und waren u. a. Inhalt der vorliegenden Arbeit.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

- Kaninchen, Chinchilla Bastard (Fa. Charles River, Bad Königshofen)

3.1.2 Zellen

- MDCK 3.K.87 (Hundenierenzellen, Zelllinie) ab der 57. Passage
- Rk13 (Kaninchennierenzellen, Zelllinie) ab der 98. Passage

3.1.3 Bakterien und Plasmide

3.1.3.1 Bakterien

- *E. coli*-Stamm: BW25141 (DATSENKO und WANNER, 2000)
- *E. coli*-Stamm: dH5 α F' (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- *E. coli*-Stamm: TOP10 (LMG194) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- *E. coli*-Stamm: TOP10 ohne F' (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.3.2 BACs („bacterial artificial chromosomes“)

- pRacH (enthalten zusammen mit pKD46 das Genom des EHV-1-Isolates RacH in *E. coli*-Stamm BW25141; RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002; RUDOLPH et al., 2002)

3.1.3.3 Plasmide

- pBAD/gIIIa (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- pCP20 (DATSENKO und WANNER, 2000)
- pEGFP-C1 (Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg)
- pEGFP-N1 (Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

- pGEX-4T-1 (Fa. Pharmacia, Karlsruhe)
- pKD13 (DATSENKO und WANNER, 2000)
- pKD46 (DATSENKO und WANNER, 2000)
- pTZ18R (Fa. Pharmacia, Karlsruhe)

3.1.4 Antikörper und Antiseren

3.1.4.1 Monoklonale Antikörper

- anti- β -Catenin (1:1.000; Fa. Sigma, München)
- anti-Flotillin-2 (ESA) (1:1.000; Fa. BD Biosciences, Heidelberg)
- anti- γ -Adaptin (1:2.000; Fa. Sigma, München)
- anti-Glutathion S-Transferase (GST) (1:1.000; Fa. Sigma, München)
- anti-Glykoprotein B (gB), 3F6 (1:3.000; ALLEN und YEARGAN, 1987)
- anti-Glykoprotein B (gB), 4B6 (1:50; MEYER und HUBERT, 1988)
- anti-Glykoprotein C (gC), 2A2 (1:5; MEYER und HUBERT, 1988)
- anti-Glykoprotein D (gD), 20C4 (1:2.000; ALLEN und YEARGAN, 1987)
- anti-Glykoprotein M (gM) (1:20; ALLEN und YEARGAN, 1987)

3.1.4.2 Polyklonale Antikörper

- anti- α -GFP (1:2.000; Fa. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- anti-Glykoprotein M (gM) (1:5.000; SEYBOLDT, 2000)
- anti-UL11 (1:300; SCHIMMER und NEUBAUER, 2003)
- anti-UL20 (1:5.000; GUGGEMOOS et al., im Druck)
- anti-UL34 (1:4.000; NEUBAUER et al., 2002)
- anti-UL45 (1:1.000; OETTLER et al., 2001)
- anti-ZO-1 (1:200; Fa. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

3.1.4.3 Direkt Fluoreszenz-markierte Antikörper

- anti-Concanavalin A (ConA) (1:3.000; Fa. Sigma, München)

3.1.4.4 Mit „Alexa“ konjugierte Antikörper

- anti-mouse “Alexa” 488 nm (1:1.000; Fa. Molecular Probes, Göttingen)
- anti-mouse “Alexa” 546 nm (1:2.000; Fa. Molecular Probes, Göttingen)
- anti-rabbit “Alexa” 488 nm (1:1.000; Fa. Molecular Probes, Göttingen)
- anti-rabbit “Alexa” 546 nm (1:2.000; Fa. Molecular Probes, Göttingen)

3.1.4.5 Mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper

- anti-Digoxigenin (DIG)-AP für Southern Blot (1:5.000; Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

3.1.4.6 Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper

- anti-mouse IgG (1:1.000; Fa. Sigma, München)
- anti-rabbit IgG (1:1.000; Fa. Sigma, München)

3.1.5 Lösungen, Puffer und Reagenzien

- **A. bidest.**, Aqua bidestillata
- **Acrylamidstammlösung**, Rotiphorese Gel 30 (Fa. Roth, Karlsruhe)
gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wäßrige 30 %ige
Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid
- **A. dest.**, Aqua destillata
- **Agarose**, peqGOLD Universal (Fa. Peqlab, Erlangen)
0,8 bis 2 % (w/v) in 0,5X Elektrophoresepuffer TAE
- **Amper**, Ammoniumpersulfat (Fa. BioRad, München)
10 % (w/v) in A. dest.
- **Antibiotika**, als Zusatz zu Bakterienkulturmedien und Nährbodenplatten

Ampicillin, 10 mg/ml	1:100	(Fa. Roche, Mannheim)
Chloramphenicol, 30 mg/ml	1:1.000	(Fa. Sigma, München)
Kanamycin, 25 mg/ml	1:500	(Fa. Applichem, Darmstadt)
Penicillin, 119,8 mg/ml	1:2.000	(Fa. Grünenthal, Aachen)
Streptomycin, 200 mg/ml	1:2.000	(Fa. Sanavita, Werne)
- **Aprotinin** (Fa. Sigma, München)
- **Arabinose** (Fa. Sigma, München)
- **Bacto Agar** (Fa. Difco, Detroit)
- **Bacto Trypton** (Fa. Difco, Detroit)
- **Bacto Yeast Extract** (Fa. Difco, Detroit)
- **BCA-Proteinbestimmungskit** (Fa. Pierce, Illinois)
- **Blockierungslösung für Southern Blot**
1X Maleinsäurepuffer mit 1 % Blocking-Reagenz (w/v)
- **Blocking-Puffer für indirekte Immunfluoreszenz (IIF)**
PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 3 % FKS (v/v)
- **Blocking-Puffer für Western Blot**
TBS-T mit 10 % Magermilchpulver (w/v)
- **Blocking-Reagenz für Southern Blot** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Bromphenolblau** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **BSE-Puffer, 10X**
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
70 mM EDTA, pH 8,0
5 % SDS (w/v)
50 % Sucrose (w/v)
- **CaCl_2** , Calciumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)

- **Chloroform** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Coomassie Brilliant Blau R-250** (Fa. Sigma, München)
- **Coomassie-Entfärber**
 - 450 ml A. dest.
 - 100 ml Eisessig
 - 450 ml Methanol
- **Coomassie-Färbelösung**
 - 225 ml A. dest.
 - 1,25 g Coomassie Brilliant Blau R-250
 - 50 ml Eisessig
 - 225 ml Methanol
- **CSPD-Lösung für Southern Blot, 25mM** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Detektionspuffer für Southern Blot, pH 9,5**
 - 0,1 M NaCl
 - 0,1 M Tris-HCl
- **Digoxigenin (DIG)-High-Prime™ Kit für Southern Blot** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **DMSO, Dimethylsulfoxid** (Fa. Sigma, München)
- **dNTP, Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **DTT, Dithiothreitol** (Fa. Sigma, München)
- **Earle's Medium** (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- **ECL, Chemiluminescence Detection Kit** (Fa. Amersham, Freiburg)
- **EDTA, Ethylendiamintetraacetat** (Fa. Serva, Heidelberg)
- **Eisessig** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Elektrophoresepuffer für Agarosegele, 50X TAE, pH 7,8**
 - 0,25 M Na-Acetat
 - 2 M Tris
 - mit Eisessig auf pH 7,8
- **Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE**
 - 193 mM Glycin
 - 0,1 % SDS (w/v)
 - 25 mM Tris
- **Ethanol, absolut** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Ethidiumbromid** (Fa. Sigma, München)
- **FKS, fetales Kälberserum, γ -bestrahlt** (Fa. Seromed, Berlin)
- **Formaldehyd** (Fa. Merck, Darmstadt)

- **Formamid** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Freund'sches Adjuvans, complete** (Fa. Sigma, München)
- **Freund'sches Adjuvans, incomplete** (Fa. Sigma, München)
- **G-418, Genitacin** (Fa. Calbiochem, Darmstadt)
- **Glucose** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Glycerin** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Glycin** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Hank's Medium** (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- **Hank's modified Eagle's Medium**
 - 4,8 g/l Earle's Medium
 - 5,3 g/l Hank's Medium
 - 1,5 g/l NaHCO_3
 - 120 mg/l Pyruvic Acid
- **Harnstoff** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **HCl, Salzsäure** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **HMFM, Hogness' modified freezing medium**
 - 4 % Glycerin (v/v)
 - 3,6 mM K_2HPO_4
 - 1,6 mM KH_2PO_4
 - 1 mM Magnesiumsulfat
 - 2 mM Natriumcitrat
- **IAC, Isoamylchloroform**
 - 24 Teile Chloroform
 - 1 Teil Isoamylalkohol
- **IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid** (Fa. Peqlab, Erlangen)
- **Isoamylalkohol** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Isopropanol** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Kaliumacetat** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **kb-Leiter, 1 kb und 12 kb** (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **KCl, Kaliumchlorid** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **K_2HPO_4 , Kaliumhydrogenphosphat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **KH_2PO_4 , Kaliumdihydrogenphosphat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Klenow-Enzym** (Fa. Roche, Mannheim)
- **Kodak GBX Entwickler** (Fa. Sigma, München)
- **Kodak GBX Fixierer** (Fa. Sigma, München)
- **Kristallviolett** (Fa. Merck, Darmstadt)

- **Kristallviolett-Färbelösung nach Witte**
 - 85 ml Ethanol, absolut
 - 250 ml Formaldehyd
 - 15 g Kristallviolett
 - mit A. dest. auf 1.000 ml
- **LB-Medium, Luria-Bertoni-Medium, pH 7,2**
 - 10 g/l Bacto Trypton
 - 5 g/l Bacto Yeast Extract
 - 5 g/l NaCl
 - mit 1 N NaOH auf pH 7,2
- **LB-Nährbodenplatten**
 - LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agar
- **Leupeptin** (Fa. Sigma, München)
- **LiCl**, Lithiumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Lipofectin® Reagent** (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- **Lysozym** (Fa. Boehringer, Mannheim)
- **Magermilchpulver** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Maleinsäure** (Fa. Sigma, München)
- **Maleinsäure-Puffer, 10X, pH 7,5**
 - 1 M Maleinsäure
 - 1,5 M NaCl
 - mit NaOH auf pH 7,5
- **Maleinsäure-Waschpuffer für Southern Blot**
 - 1X Maleinsäure-Puffer mit 0,3 % Tween 20 (v/v)
- **MBS, Morpholinoethansulfonsäure Buffered Saline, pH 6,5**
 - 25 mM MES
 - 150 mM NaCl
- **MC 4000, Methylzellulose** (Fa. Sigma, München)
 - 25 g auf 1.000 ml A. dest.
- **2-Mercaptoethanol** (Fa. Sigma, München)
- **MES, Morpholinoethansulfonsäure** (Fa. vwr, München)
- **Methanol, absolut** (Fa. Merck, Darmstadt)

- **Methylzellulose zur Überschichtung von Zellen**
Methylzellulose und Doppel-MEM (1:1)
5 % FKS
1:100 NaHCO_3
1:2.000 Penicillin
1:2.000 Streptomycin
- **MgCl_2 , Magnesiumchlorid** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **MgSO_4 , Magnesiumsulfat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **MnCl_2 , Manganchlorid** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Molekulargewichtsmarker, vorgefärbt** (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **Molekulargewichtsmarker, Precision Prestained Broad Range**
(Fa. BioRad, München)
- **MOPS, 4-Morpholinpropansulfonsäure, 99,5 %** (Fa. Sigma, München)
- **Na-Acetat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Na-Citrat** (Fa. Sigma, München)
- **NaCl, Natriumchlorid** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaHCO_3 , Natriumhydrogencarbonat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaH_2PO_4 , Natriumdihydrogenphosphat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Na_2HPO_4 , Dinatriumhydrogenphosphat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaN_3 , Natriumazid** (Fa. Sigma, München)
- **NaOH, Natronlauge** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Na_3PO_4 , Trinatriumphosphat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **N-Laurylsarkosin, Na-Salz, 30 % (w/v)** (Fa. Sigma, München)
- **NP-40, Nonidet P-40** (Fa. Sigma, München)
- **Paraformaldehyd** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **PBS, Phosphate Buffered Saline, pH 7,4**
0,1 g CaCl_2
0,2 g KCl
0,2 g KH_2PO_4
0,1 g MgCl_2
8 g NaCl
1,12 g Na_2HPO_4
mit A. dest. auf 1.000 ml
- **PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}** (wie PBS, ohne CaCl_2 und MgCl_2)
- **PerFectin™ Transfektionsreagenz** (Fa. Gene Therapy Systems, San Diego)

- **PFA**, Paraformaldehyd für IF, 2 %ig
0,4 g Paraformaldehyd
10 ml A. bidest.
10 ml 2X Phosphatpuffer für IF
2-3 Tropfen NaOH
- **Pfu-DNS-Polymerase** (Fa. Stratagene, Heidelberg)
- **Phenol**, pH 8,0 (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Phenolrot** 0,1 % (w/v) (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Phosphatpuffer für IF**, 2X, pH 7,4
13,799 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
13,609 g KH_2PO_4
mit A. dest. auf 500ml
- **PMSF**, Phenylmethylsulfonylfluorid (Fa. Sigma, München)
- **Prähybridisierungslösung für Southern Blot**
20 g Blocking-Reagenz
50 ml Formamid
350 μl N-Laurylsarkosin, Na-Salz, 30 % (w/v)
100 μl SDS 20 % (w/v)
25 ml SSC, 20X
mit A. dest. auf 1.000 ml
- **Probenpuffer für SDS-PAGE (4X)**
2,5 ml A. dest.
0,1 ml Bromphenolblau 5 % (w/v)
1 ml Glycerin
0,4 ml 2-Mercaptoethanol
4 ml SDS 20 % (w/v)
0,5 ml Tris-HCl, pH 6,8
- **Proteinasehemmer-Cocktail**
0,002 mg/ml Aprotinin
0,002 mg/ml Leupeptin
0,1 mg/ml PMSF
0,05 mg/ml TLCK
0,1 mg/ml TPCK
- **Proteinase K** (Fa. Sigma, München)
10 mg in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
- **Pyruvic Acid** (Fa. Sigma, München)
- **Qiagen Maxi und Midi Kit** (Fa. Qiagen, Hilden)

- **Qiagen-Puffer 1, Resuspensionspuffer (Fa. Qiagen, Hilden)**
 - 10 mM EDTA
 - 100 µg/ml RNase A
 - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- **Qiagen-Puffer 2, Lysispuffer (Fa. Qiagen, Hilden)**
 - 200 mM NaOH
 - 1 % SDS (w/v)
- **Qiagen-Puffer 3, Neutralisationspuffer, pH 5,5 (Fa. Qiagen, Hilden)**
 - 3 M Kaliumacetat
- **RbCl₂, Rubidiumchlorid (Fa. Sigma, München)**
- **Restriktionsendonukleasen (Fa. MBI, St. Leon-Rot; Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.; Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)**
- **Ripa-Lysispuffer**
 - 150 mM NaCl
 - 0,5 % Natriumdesoxycholat (w/v)
 - 1 % NP-40 (v/v)
 - 0,1 % SDS (w/v)
 - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
 - + Proteinasehemmer-Cocktail
- **RNase A, Ribonuklease A (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)**
 - 100 mg in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
- **Saline**
 - 1 g Glucose
 - 3 mM KCl
 - 1,5 mM KH₂PO₄
 - 140 mM NaCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 10 ml Phenolrot 0,1 % (w/v)
 - mit A. dest. auf 100 ml
- **Sarkosylpuffer**
 - 25 mM EDTA
 - 10 % N-Lauroylsarkosin, Na-Salz (w/v)
 - 75 mM Tris-HCl, pH 8,0
- **SDS, Natrium-Dodecylsulfat (Fa. Applichem, Darmstadt)**
 - 20 % (w/v) in A. dest.

- **SOB-Medium**
 - 2 % Bacto Trypton
 - 0,5 % Bacto Yeast Extract
 - 2,5 mM KCl
 - 10 mM MgCl_2
 - 10 mM MgSO_4
 - 10 mM NaCl
- **SOG-Medium**
 - SOB-Medium mit 1 % Glucose
- **SSC, Standard Saline Citrat, 20X**
 - 0,3 M Na-Citrat
 - 3 M NaCl
- **STET-Puffer**
 - 1 mM EDTA, pH 8,0
 - 0,1 M NaCl
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 - 0,5 % Triton X-100 (v/v)
- **STV, Saline-Trypsin-Versene-Lösung**
 - 100 ml Saline
 - 50 ml Trypsin 1,25 % (w/v)
 - 25 ml Versene
 - 10 ml NaHCO_3
- **Sucrose (Fa. Merck, Darmstadt)**
 - 30 % (w/v) in MES
 - 30 % (w/v) in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
- **TALON-Lysis-Puffer, Urea-Puffer, pH 8,0 und pH 7,0**
 - 50 mM NaH_2PO_4
 - 10 mM Tris
 - 8 M Urea
- **Taq-DNS-Polymerase (Fa. Stratagene, Heidelberg)**
- **T4-DNS-Ligase mit 10X Ligasepuffer (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)**
- **TBS-T-Puffer**
 - 150 mM NaCl
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 - 0,05 % Tween 20 (v/v)
- **TEMED, Tetramethylethyldiamin (Fa. Sigma, München)**

- **TEN-Puffer**
 - 1 mM EDTA
 - 150 mM NaCl
 - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
- **TE-Puffer, pH 8,0**
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris
- **TFB-I-Puffer, pH 5,8**
 - 10 mM CaCl_2
 - 15 % Glycerin (v/v)
 - 30 mM Kaliumacetat
 - 50 mM MnCl_2
 - 100 mM RbCl_2
 - mit NaOH auf pH 5,8
- **TFB-II-Puffer**
 - 75 mM CaCl_2
 - 15 % Glycerin (v/v)
 - 10 mM MOPS, pH 7,0
 - 10 mM RbCl_2
- **TLCK, N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon** (Fa. Sigma, München)
- **Towbin-Puffer, pH 8,3**
 - 192 mM Glycin
 - 20 % Methanol (v/v)
 - 25 mM Tris
- **TPCK, $\text{N}\alpha$ -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon** (Fa. Sigma, München)
- **Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Tris-HCl, pH 8,0**
- **Tris-Puffer für SDS-PAGE-Sammelgel**
 - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- **Tris-Puffer für SDS-PAGE-Trenngel**
 - 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- **Triton X-100** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Trypsin** (Fa. Serva, Heidelberg)
- **Tween 20, Polyoxyethylensorbitan** (Fa. BioRad, München)

- **Versene**
 - 3 mM KCl
 - 1,5 mM KH_2PO_4
 - 140 mM NaCl
 - 10 mM Na_2HPO_4
 - mit A. dest. auf 100 ml
- **Waschlösung 1 für Southern Blot**
 - 0,1 % SDS
 - 2X SSC
- **Waschlösung 2 für Southern Blot**
 - 0,1 % SDS
 - 0,1X SSC
- **Zellfraktionierungspuffer A**
 - 0,5 mM CaCl_2
 - 2 mM MgCl_2
 - 5 mM Na-Phosphat, pH 7,5
 - + Proteinasehemmer-Cocktail
- **Zellfraktionierungspuffer B**
 - 1 mM CaCl_2
 - 2 mM EDTA
 - 10 % Glycerin (v/v)
 - 0,5 mM MgCl_2
 - 0,3 M NaCl
 - 0,5 % NP-40 (v/v)
 - 20 mM Tris-HCl, pH 9,0
 - + Proteinasehemmer-Cocktail
- **Zitrat-Puffer, pH 3,0**
 - 10 mM KCl
 - 135 mM NaCl
 - 40 mM Zitronensäure
- **Zitronensäure (Fa. Sigma, München)**

3.1.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- **Centricon Zentrifugen-Filtrationsröhrchen** (Fa. Millipore, Schwalbach)
- **Chromatographiepapier 3MM** (Fa. Whatman, UK)
- **Controlled Environment Incubator Shaker** (Fa. New Brunswick Scientific, USA)
- **Dialyseschläuche Spectra/Por® MWCO 6.000-8.000** (Fa. Spectrum, USA)
- **Elektrophoresekammer Mupid-21** (Fa. Cosmo Bio Co., Tokio)
- **Elektrophoresekammer für PAGE-Gele: Mini-Protean II**
(Fa. BioRad, München)
- **Elektrophoretische Transferkammer: Mini-Transblot II** (Fa. BioRad, München)
- **Eppendorf Reaktionsgefäß, 1,5 ml und 2 ml** (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- **Geltrockner Biometra®** (Fa. Whatman, UK)
- **Glutathion Sepharose® 4B** (Fa. Pharmacia Biotech, Schweden)
- **Horizontalelektrophoresekammer Horizon® 58** (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- **Hyperfilm** (Fa. Amersham, UK)
- **Kodak GBX Filme** (Fa. Sigma, München)
- **Konfokales Laserscan-Mikroskop**
- **Kryoröhrchen CryoTube™ Vials, 2 ml** (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- **Küvetten Gene Pulser®** (Fa. BioRad, München)
- **Messokular** (Fa. Zeiss, Jena)
- **Migel ice line KF75** (Fa. KKS GmbH, München)
- **Mikroskop für IF**
Axioskop 2 (Fa. Zeiss, Jena)
Axiovert 25 (Fa. Zeiss, Jena)
- **Nitrocellulose Protran BA83**
Schleicher & Schuell (Fa. vwr, München)
- **Nylon-Transfermembran**
Hybond-N+ (Fa. Amersham, UK)
- **pH-Meter** (Fa. Beckman, Krefeld)
- **Photometer**
GeneQuant (Fa. Amersham, UK)
Uvikon xs (Fa. Bio-Tek, Bad Friedrichshall)
- **Pipetboy comfort** (Fa. Integra Biosciences, Fernwald)
- **Power Supply Power Pac 200** (Fa. BioRad, München)
- **Präzisionswaage Navigator™** (Fa. Ohaus, Giessen)
- **PVDF, Polyvinylidenfluorid Transfermembran**
Hybond-P (Fa. Amersham, UK)

- **Rührplattform IKA Combimag RCH** (Fa. IKA, Staufen)
- **Southern Blot Transfer-Apparatur Biometra Vacu-Blot** (Fa. Whatman, UK)
- **Thermocycler Gene Amp PCR-System** (Fa. Perkin Elmer, Frankfurt a. M.)
- **Thermomixer compact** (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- **Ultrafiltrationsröhrchen Centricon®** (Fa. Millipore, Schwalbach)
- **Ultraschallwasserbad Transsonic T310** (Fa. Elma, Singen)
- **Vakuum-Blot-Gerät** (Fa. Biometra, Göttingen)
- **Vortex-Genie™** (Fa. Scientific Industries, Puchheim)
- **Wasserbad Julabo SW-20C** (Fa. Julabo, Seelbach)
- **Zellkulturplastikwaren**
 - Zellkulturflaschen (175 cm², 75 cm² und 25cm²) (Fa. Nunc, Wiesbaden)
 - 6-, 24- und 96-Loch-Platten (Fa. Nunc, Wiesbaden)
 - 12-Loch-Transwell®-Filterplatten mit Polyester- oder Polycarbonat-Membraneinsätzen (Fa. Corning Incorporated, USA)
- **Zellwiderstandsmesser Millicell®-ERS** (Fa. Millipore, Schwalbach)
- **Zentrifugen**
 - Kühlzentrifuge Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (Fa. Heraeus, Hanau)
 - Rotor 12.500 (Fa. Heraeus, Hanau)
 - Rotor SS34 (Fa. DuPont Sorvall, Bad Homburg)
 - Kühlzentrifuge Sigma 4K10 (Fa. Sigma, München)
 - Kühlzentrifuge Sigma 202MK (Fa. Sigma, München)
 - Stock-Zentrifuge (Fa. Stock, Marburg)
 - Tischultrazentrifuge TL100 (Fa. Beckman, Krefeld)
 - Rotor TLA 45
 - Rotor TLA 100
 - Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K (Fa. Beckman, Krefeld)
 - Rotor SW 28
 - Rotor SW 40

3.2 Methoden

3.2.1 Zellen

3.2.1.1 Zellkultur

Die permanenten Zelllinien Rabbit Kidney (Rk13)- und Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen wurden in Hank's modified Eagle's Medium mit einem Zusatz von 5 bis 10 % fetalem Kälberserum (FKS) in Plastik-Zellkulturflaschen bei 37°C kultiviert. Zur regelmäßigen Passagierung wurden die Zellen mit Saline-Trypsin-Versene-Lösung (STV) behandelt. Die durch den Trypsinanteil gelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und nach Bedarf auf weitere Zellkulturflaschen oder -platten verteilt.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen kryokonserviert. Dazu wurden am Vortag passagierte Zellen (ca. 1×10^6) mit STV gelöst und bei 1.000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) (Stock-Zentrifuge) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Zellkulturmedium mit je 10 % FKS und Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen portioniert. Nach vierstündiger Abkühlung auf 4°C wurden die Zellen bei -70°C eingefroren und zur dauerhaften Lagerung bei -120°C aufbewahrt.

3.2.1.3 Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot

Je nach Fragestellung wurden infizierte oder nicht-infizierte Zellen verwendet. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit kalter Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und mit Ripa-Lysispuffer gelöst. Mit einem Schaber wurden die lysierten Zellen nach 5 min vom Flaschenboden geschabt und wurden in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Um die entstandenen Lysate auf einen gleichen Proteingehalt einstellen zu können, wurde der Proteingehalt der Proben mit Hilfe eines BCA-Proteinbestimmungskits nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.2.1.4 Zellfraktionierung

Mit zwei Plaquebildenden Einheiten (PbE) pro Zelle infizierte, am Vortag geteilte Zellen wurden nach 0 und 14 h mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und in 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} geschabt. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 800 rpm für 10 min (Stock-Zentrifuge) abzentrifugiert, das Pellet in 30fachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A aufgenommen und für 10 min auf Eis belassen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 3.000 rpm und 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) wurde das Zellpellet in zehnfachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A gelöst. Der Ansatz wurde bei -70°C gefroren, aufgetaut und mit Ultraschall (dreimal 5 s) behandelt. Nach Zugabe von Sucrose auf eine Endkonzentration von 0,3 M wurden die durch die Ultraschallbehandlung freigesetzten Zellkerne bei 800 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) pelletiert (Kernpellet).

Der Überstand wurde zur Entfernung von Kernresten erneut bei 1.000 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) zentrifugiert und mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 rpm in 60 min bei 4°C (Tischultrazentrifuge TL100, Rotor TLA 100) in eine zytoplasmatische Fraktion (Überstand) und eine Membranfraktion (Pellet) aufgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei -20°C gelagert.

Das Pellet wurde in 100 µl Zellfraktionierungspuffer B resuspendiert und mit Ultraschall (dreimal 15 s) behandelt. Nicht lysierte Anteile wurden pelletiert (1.500 rpm, 15 min, 4°C; Kühlzentrifuge Sigma 202MK) und verworfen. Der Überstand, der die Membranfraktion darstellt, wurde bei -20°C gelagert.

Das noch Zellbestandteile enthaltende Kernpellet wurde in zehnfachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A mit 0,3 M Sucrose gelöst und vorsichtig auf ein Zuckerkissen aus Zellfraktionierungspuffer A mit 1,62 M Sucrose gesetzt. Innerhalb von 15 min wurden die Zellkerne bei 2.100 rpm und 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) pelletiert. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde das Pellet in 20fachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A mit 0,5 % Triton X-100 resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.000 rpm, 15 min, 4°C; Kühlzentrifuge Sigma 202MK). Das resultierende Pellet wurde in 100 µl Zellfraktionierungspuffer B aufgenommen, dreimal für je 15 min mit Ultraschall behandelt und bei 1.500 rpm 15 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) zentrifugiert. Der die Kernfraktion enthaltende Überstand wurde abgenommen, bei -20°C gelagert und das Pellet verworfen.

3.2.1.5 Lipid Raft-Präparation

Zur Isolierung von Lipid Rafts wurden je zwei große Zellkulturflaschen über ein oder drei Tage gewachsener TCGFPC43-Zellen mit H Δ 43 infiziert (3 PbE pro Zelle, 18 h) oder uninfiziert belassen und in kaltes PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ geschabt und bei 800 rpm für 10 min (Stockzentrifuge) abzentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ und Morpholinoethansulfonsäure (MES) Buffered Saline (MBS) wurde das Zellpellet in 1,5 ml MBS mit 1 % Triton X-100 und Proteinasehemmercocktail aufgenommen. Die Lysate wurden für 20 min bei 4°C inkubiert, zur Freisetzung der Zellkerne zehnmal für je 15 s mit Ultraschall behandelt, mit 1,5 ml 80 %iger Sucrose in MBS vermengt und in SW40-Röhrchen verbracht. Das Gemisch wurde vorsichtig mit 6 ml 30 %iger und 4 ml 5 %iger Sucrose in MBS überschichtet und 18 h bei 35.000 rpm und 4°C (Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K, Rotor SW 40) zentrifugiert. Der Sucrosegredient wurde von oben nach unten milliliterweise abgenommen, das Pellet in 1 ml MBS resuspendiert, jeder Fraktion Proteinasehemmercocktail zugegeben und diese bei -20°C gelagert. Zur weiteren Untersuchung wurden Aliquots im Western Blot eingesetzt.

3.2.1.6 Transfektion eukaryotischer Zellen mit PerFectin™ oder Lipofectin®

Mit Hilfe von Transfektionsreagenzien, wie zum Beispiel PerFectin™ oder Lipofectin®, kann DNS in eukaryotische Zellen eingebracht werden.

Dazu wurden die nach Herstellerhinweis gefertigten Transfektionsansätze auf 50 bis 80 % konfluente, am Vortag geteilte Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten gegeben und die transfizierten Zellen unter 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde der Transfektionsansatz durch Zellkulturmedium mit Zusatz von 5 % FKS ersetzt.

3.2.1.7 Herstellung rekombinanter Zelllinien

Eukaryotische Zellen können Fremdgene stabil exprimieren. Zur Generierung solcher rekombinanter Zelllinien ist es notwendig, die Fremd-DNS in das Wirtszellgenom zu integrieren.

Als Träger des Fremdgens wurden Plasmide gewählt, die das bakterielle Gen *neo^r* besitzen. Das Produkt dieses Gens, die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase, inaktiviert Geniticin (G-418) durch Phosphorylierung. Dadurch wird eine Selektion auf stabil transfizierte Zellen mittels G-418 ermöglicht. Zusätzlich tragen die gewählten Vektoren das GFP-Gen, das mit dem inserierten Fremdgen fusioniert ist.

Mit ausgesuchten Plasmiden transfizierte Zellen wurden nach 48 h mit STV gelöst, in frischem Zellkulturmedium mit 10 % FKS und 600 µg/ml G-418 resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Nach weiteren 48 h wurde der Überstand abgenommen und durch eine Mischung aus 50 % frischem Medium und 50 % zwei Tage altem Zellkulturüberstand mit 10 % FKS und 600 µg/ml G-418 ersetzt. Um den Selektionsdruck auf die Zellen stabil zu halten, wurde alle 48 h das Medium wie beschrieben gewechselt. Nach zwei bis drei Wochen wurden die gewachsenen Zellklone mit STV gelöst und in 96-Loch-Platten gesät. Um einem Verlust des Fremdgens vorzubeugen, wurden der rekombinanten Zelllinie 600 µg/ml G-418 zu jeder 5. Passage ins Zellkulturmedium zugegeben.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot wurde die Expression des Fremdgens nachgewiesen.

3.2.2 Virus

3.2.2.1 Verwendete Virusstämme

Für die beschriebenen Untersuchungen wurden sowohl attenuierte als auch nicht attenuierte EHV-1-Stämme verwendet. Der auf embryonalen Schweinenierenzellen (ENS) passagierte Impfstamm RacH (MAYR et al., 1968; HUBERT et al., 1996) ist für den natürlichen Wirt und für Labortiere avirulent. Die Plaqueisolate des Stammes RacL11 dagegen gelten gleichfalls für den natürlichen Wirt wie für Labortiere als virulent.

3.2.2.2 Virusvermehrung in Zellkultur

Die Ausgangsviren RacH und RacL11 wurden auf Rk13-Zellen vermehrt. Zu diesem Zweck wurden 80 bis 90 % konfluente, am Vortag geteilte Zellen nach Zugabe von frischem Zellkulturmedium mit 0,05 PbE pro Zelle infiziert. Bei einem zytopathischen Effekt (zpE) von 80 bis 90 % wurden die Zellen zur Freisetzung der intrazellulären Virionen zweimal gefriergetaut (-70°C/RT). Die zellulären Bestandteile wurden bei 1.000 rpm für 10 min (Stock-Zentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand portioniert bei -70°C gelagert.

3.2.2.3 Virustitration

Zur Bestimmung des Virustiters in PbE pro ml Virussuspension wurde diese in 10er-logarithmischen Schritten verdünnt.

Dazu wurde der Virusstock in Stufen von 10^{-1} bis 10^{-7} mit Medium verdünnt und in Doppelansätzen zu je 1 ml/Loch auf konfluente Zellen in einer 24-Loch-Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei 37°C, in der die Viruspartikel an die Zellen adsorbieren können, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Um eine Ausbreitung der Nachkommen-Viren über das Medium zu verhindern, wurden die Zellen mit Methylzellulose überschichtet. Nach drei bis fünf Tagen wurden die gebildeten Plaques in den verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt und damit der Titer des Virusstocks berechnet.

3.2.2.4 Präparation viraler DNS

Mit 0,1 PbE pro Zelle infizierte Zellen (ca. 6×10^7) wurden bei einem zpE von 100 % zur Freisetzung intrazellulärer Virionen zweimal gefriergetaut (-70°C/RT). Bei 28.000 rpm und 4°C wurde das Virus-Zell-Gemisch für 3 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K, Rotor SW 40) und das entstandene Pellet in 900 µl TEN-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit 450 µl Sarkosylpuffer für 15 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl RNase A und einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurde dem Ansatz zur Zerstörung zellulärer und viraler Proteine 100 µl Proteinase K zugegeben. Bis zum Erhalt einer klaren Lösung wurde das Gemisch bei 56°C über Nacht (ÜN) inkubiert. Im folgenden Schritt wurden restliche Protein- und Fettbestandteile mittels Phenol extrahiert. Dazu wurde dem Ansatz Phenol im Verhältnis 1:1 zugegeben und 100mal geschwenkt. Nach einer Verweildauer von 20 min auf Eis wurde die Emulsion bei 8.000 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 202MK), der Überstand mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen und der Extraktionsschritt wiederholt. Daraufhin wurde der Überstand zweimal mit jeweils doppelter Menge Isoamylchloroform (IAC) behandelt, um Phenolreste zu entfernen. Um ein Ausfällen der DNS zu erreichen, wurde der Ansatz mit doppeltem Volumen absolutem Ethanol und 1/10 des Volumens 4 M Lithiumchlorid versetzt. Die DNS wurde bei 13.000 rpm 20 min und 4°C abzentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNS-Pellet wurde in A. dest. resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 **Aufreinigung extrazellulärer Virionen**

Der Überstand von mit 2 PbE pro Zelle über 16 h infizierten Zellen wurde bei 2.000 rpm in 10 min (Stock-Zentrifuge) von Zellresten getrennt. Nach Schichtung auf 30 %ige Sucrose in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurde der Überstand bei 23.000 rpm und 4°C für 3 h (Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K, Rotor SW 28) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 500 µl Medium resuspendiert, zweimal für 10 bis 15 min in Eiswasser mit Ultraschall behandelt und erneut durch ein 30 %iges Sucrosekissen zentrifugiert (28.000 rpm, 90 min, 4°C; Tischultrazentrifuge TL100, Rotor TLA 45). Nach Aufnahme des Pellets in 1 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , erneuter Ultraschallbehandlung in Eiswasser und einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 28.000 rpm für 90 min bei 4°C (Tischultrazentrifuge TL100, Rotor TLA 45) wurde das Pellet, das die gereinigten Virionen enthielt in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen und bei -70°C gelagert.

3.2.3 **DNS**

3.2.3.1 **Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden DNS-Segmente amplifiziert. Zu jedem Einzelstrang der Matrize wurde ein komplementäres Oligonukleotid (Primer) synthetisiert (Fa. MWG Biotech, Ebersberg), das einer thermostabilen DNS-Polymerase als Startpunkt für die Synthese des entsprechenden Gegenstranges in 5'-3'-Richtung diente.

Im ersten Schritt dieser dreiphasigen Standard-PCR (SAIKI et al., 1988) wird die als Matrize dienende doppelsträngige DNS durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95°C in Einzelstränge geteilt. An die so entstandenen Einzelstränge lagern sich die Primer (Tab. 1) bei der ihnen zugehörigen Schmelztemperatur an. Bei Optimaltemperatur der DNS-Polymerase (*Pfu*-DNS-Polymerase 74°C, *Taq*-DNS-Polymerase 72°C) werden ausgehend von den Primern komplementäre Gegenstränge zu den Einzelsträngen der Matrize synthetisiert. Diese Phasen werden in einem Thermocycler bis zu 30mal wiederholt. Der Reaktionsansatz für die vorliegende PCR bestand aus der DNS-Matrize, Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphaten (dNTP), MgCl_2 , DMSO, der DNS-Polymerase mit ihrem mitgelieferten Reaktionspuffer und A. dest.

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur T_m
UL43up	5' - ATA GGA TCC ATA TGT GTG ATT ATA GTT GC - 3'	61,0 °C
UL43low	5' - ATA GAA TTC CAT GAT GTA CCA GCC AGA TA - 3'	62,4 °C
UL43truncup	5' - ATA TTC TAG AGT TTG CCA CAC GTT GGA AA - 3'	62,4 °C
UL43truncdown	5' - ATA GGT ACC ATG GCT ATC GCT ATT ATA GCT TCC TG - 3'	68,3 °C
UL43miniup	5' - ATA TAA GCT TCT TGT AGT CCG ATT CCA A - 3'	60,7 °C
UL43minilow	5' - ATA GAA TTC ATG ATG TAC CAG CCA GAT - 3'	60,4 °C

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Primer.

3.2.3.2 Präparation und Aufreinigung von DNS nach PCR oder Restriktionsenzymverdau

In Abhängigkeit von der zu erwartenden Größe des DNS-Fragmentes wurde der Reaktionsansatz mit BSE-Puffer vermengt in 0,8 bis 2 %ige Agarosegele eingesetzt und bei einer Gleichspannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente wurde das Gel zusätzlich mit einer kb-Leiter beschickt. Die Gele enthielten 0,0005 % Ethidiumbromid, um die DNS nach der Auftrennung unter UV-Licht (302 nm) sichtbar zu machen.

Nach Dokumentation wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel geschnitten und mit Hilfe eines DNA-Purification Kits nach Herstellerhinweis aufgereinigt. Die gereinigte DNS wurde mit 50 µl 10 mM Tris, pH 8,0 eluiert und anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.3.3 DNS-Konzentrationsbestimmung

Durch photometrische Messung (Photometer Uvikon xs) der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration von in A. dest. gelöster DNS bestimmt.

3.2.3.4 DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden Plasmid-, BAC- und virale DNS gespalten. Zusammen mit der zu spaltenden DNS wurden 5 bis 10 Einheiten Restriktionsenzym pro μg DNS mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet und bei 37°C (Plasmid-DNS für 1 h, BAC- und virale DNS für 3 h) verdaut. Nach anschließender Inaktivierung des Enzyms durch entsprechende Temperaturänderung oder Zugabe von BSE-Puffer konnten die entstandenen Fragmente, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt (Plasmid-DNS bei 100 V, BAC- und virale DNS bei 50 V), dokumentiert, ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

3.2.3.5 Ligation von DNS-Fragmenten

Nach vorangegangenem Restriktionsenzymverdau können DNS-Fragmente durch eine T4-DNS-Ligase wieder miteinander verbunden werden.

Passen nach einem solchen Verdau die Enden der DNS-Fragmente zueinander, können diese sofort ligiert werden. Sind beide Ligationsarme nicht komplementär zueinander, müssen die vorhandenen Lücken mit dNTP's aufgefüllt werden, um stumpfe Enden zu erhalten.

Das hierzu eingesetzte Klenow-Enzym (DNS-Polymerase I-Fragment) katalysiert die Addition von Mononukleotiden vom 5'-Phosphat- zum 3'-OH-Ende eines DNS-Fragmentes und schneidet überlappende Enden vom 3'-OH-Ende zum 5'-Phosphat-Ende. Dem Restriktionsenzymverdau wurde dazu eine Einheit des Klenow-Enzyms, 1X des entsprechenden Puffers und 1 mM dNTPs zugesetzt und dieser für 60 min bei 37°C inkubiert. Lineare DNS-Fragmente mit überlappenden oder stumpfen Enden wurden mit Hilfe einer T4-DNS-Ligase, die unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch komplementäre 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden verbindet, ligiert (SAMBROOK und RUSSEL, 2001). Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65°C gestoppt und der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.6 DNS-DNS-Hybridisierung (Southern Blot)

Markierung von DNS mit Digoxigenin (DIG)

Mit Hilfe des „random primed labeling“ (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983) werden bestimmte DNS-Fragmente markiert. An die zu markierende, denaturierte DNS lagern sich Oligonukleotide mit einer Zufallssequenz, die als Primer für eine DNS-abhängige DNS-Polymerase dienen. Auf diese Weise werden der Matrize komplementäre Gegenstränge synthetisiert, in die durch Verwendung des DIG-High-Prime™ Kits DIG-markierte dNTP's eingebaut werden. Die nach Herstellerangaben aus einem durch PCR oder Restriktionsenzymverdau gewonnenen DNS-Fragment gefertigte DNS-Sonde wurde für 10 min gekocht, in 15 ml Prähybridisierungslösung aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

Transfer von DNS durch Southern Blot

Die Fragmente von viraler- oder BAC-DNS wurden nach Restriktionsenzymverdau in 0,8 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung in einem 0,0005 %igen Ethidiumbromidbad zur Dokumentation fotografiert. Anschließend wurde das Gel, um den Transfer hochmolekularer Fragmente zu erleichtern, 5 min mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt, was zu Einzelstrangbrüchen in DNS-Molekülen führte. Mit Hilfe eines Vakuum-Blot-Gerätes wurde die DNS vom Agarosegel auf eine Nylon-Transferrmembran überführt. Hierbei wurden übereinander das Chromatographiepapier 3MM, die Nylon-Transferrmembran und das Agarosegel auf eine poröse Platte gelegt und durch eine Vakuumpumpe ein Unterdruck von 100 bis 150 mbar für eine Stunde auf dieses System erzeugt.

Zur Denaturierung der DNS und ihrer Fixierung auf der Membran wurde das Gel mit 0,4 N Natronlauge überschichtet. Im Anschluss wurde die Nylon-Transferrmembran mit der DNS für zwei Stunden bei 80°C getrocknet.

DNS-DNS-Hybridisierung

Zur Prähybridisierung wurde die getrocknete Nylon-Transferrmembran für ein bis drei Stunden bei 45°C in Prähybridisierungslösung geschaukelt. Daraufhin wurde die Prähybridisierungslösung durch die zuvor für 10 min auf 68°C erhitzte Sonde ersetzt und ÜN bei 45°C unter Schaukeln hybridisiert. Die Sonde wurde abgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Um Rückstände der Sonde auf der Nylon-Transferrmembran zu entfernen, wurde diese zweimal für 5 min mit Waschlösung 1 für Southern Blot bei RT und zweimal für 15 min mit Waschlösung 2 für Southern Blot bei 68°C gewaschen.

Immundetektion

Die DIG-markierte DNS wurde mit einem mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten anti-DIG-Antikörper detektiert und die Reaktion durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach kurzem Äquilibrieren der Nylon-Transferrmembran in Maleinsäure-Waschpuffer durch einstündige Inkubation in Blockierungslösung geblockt. Der in einer Verdünnung von 1:5.000 in Blockierungslösung aufgenommene anti-DIG-Antikörper wurde daraufhin für eine weitere Stunde auf der Nylon-Transferrmembran belassen. Nach zweimaligem Waschen in Maleinsäure-Waschpuffer für je 15 min wurde die Membran für 2 bis 5 min in Detektionspuffer äquilibriert und mit 3 ml der Chemilumineszenz-Lösung (CSPD 1:100 in Detektionspuffer) in Folie eingeschweißt. Nach 5 min bei RT wurde die Membran eingeschweißt für 5 bis 15 min bei 37°C inkubiert. Mittels Röntgenfilm wurde die Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dazu wurde der Film auf die Membran gelegt und nach 10 min Belichtungszeit entwickelt.

3.2.3.7 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS

Präparation kompetenter Bakterien

In 100 ml LB-Medium wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur (ÜNK) der Bakterienstämme DH5 α F' oder TOP10 verdünnt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) von 0,4 bis 0,55 bei 37°C vermehrt. Nach zehnmütigem Abkühlen der LB-Bakterien-Lösung auf Eis wurden die Bakterien bei 3.000 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml kaltem TFB-I-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis belassen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3.000 rpm, 10 min, 4°C; Kühlzentrifuge Sigma 4K10) wurde das Pellet in 4 ml TFB-II-Puffer aufgenommen, zu je 60 μ l portioniert und die Aliquots bei -70°C gelagert.

Transformation

Nach Auftauen der kompetenten Bakterien auf Eis wurde die Hälfte eines Ligationsansatzes zugegeben und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die DNS wurde durch Thermoschock (2 min bei 42°C), der die Bakterienwand für kurze Zeit durchlässig macht, und anschließend Abkühlen auf Eis in die Bakterien eingebracht. Anschließend wurden 200 μ l SOG-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37°C für eine Stunde geschaukelt. Zur Selektion auf transformierte Bakterien wurde die hochgeschüttelte Suspension auf LB-Nährbodenplatten mit Antibiotikum-Zusatz ausgestrichen. Das jeweilige Antibiotikum entsprach dem Resistenzgen des transformierten Vektors. Die Platten wurden für 12 bis 16 h bei 37°C bebrütet. Gewachsene Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz ÜN bei 37°C geschaukelt.

3.2.3.8 Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien

In 2 ml LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz wurden Bakterien, die das gewünschte Plasmid trugen, ÜN bei 37°C geschaukelt und anschließend bei 8.000 rpm für 5 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 375 μ l STET-Puffer mit Lysozym resuspendiert, gevortext und für 45 s gekocht. Die hierdurch lysierten und denaturierten Bakterienbestandteile wurden bei 12.000 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) pelletiert und entfernt.

Durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und 40 µl 4 M Lithiumchlorid wurde die im Überstand vorhandene Plasmid-DNS gefällt und für 25 min bei 13.500 rpm bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer mit RNase A aufgenommen. Die erhaltene Plasmid-DNS wurde mittels Restriktionsenzymverdau (3.2.3.4) auf Größe und Orientierung des Inserts kontrolliert.

Zur Gewinnung größerer Mengen bakterieller Plasmid-DNS wurde der Qiagen Midi Kit nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.3.9 Konservierung von Bakterien

In 2 ml LB-Medium mit Antibiotikuzusatz wurden die Bakterien mit dem gewünschten Plasmid ÜN bei 37°C vermehrt und bei 4.000 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Hogness' modified freezing medium (HMFm) resuspendiert, zu je 1 ml portioniert und bei -70°C gelagert.

3.2.4 Herstellung rekombinanter Viren

Durch homologe Rekombination, bei der zu deletierende Sequenzen des viralen Genoms durch heterologe DNS-Sequenzen, die von homologen Bereichen des viralen Genoms flankiert sind, ersetzt werden, können rekombinante Viren generiert werden.

Das rekombinante Virus dieses Projektes wurde durch Mutagenese des als „bakterielles artifizielles Chromosom“ (BAC) klonierten EHV-1-Stammes RacH hergestellt. Dabei findet die homologe Rekombination in *E. coli* statt und ist dadurch zunächst vom Wachstum der Viren in eukaryotischen Zellen unabhängig.

3.2.4.1 BAC-Mutagenese

Die zu mutagenisierenden, viralen Genome müssen für die BAC-Mutagenese zirkulär und extrachromosomal in *E. coli* vorliegen.

In dem hier angewendeten BAC-Mutagenese-System tragen die Bakterien (BW25141) neben dem jeweiligen als BAC-Klon vorliegenden EHV-1-Isolat das temperatursensitive und ampicillinresistente Plasmid pKD46 („Red helper plasmid“), das für die Gene *bet*, *gam* und *exo* und für die Rekombinase des Bakteriophagen λ kodiert. Diese Rekombinase („Red recombinase“) vermittelt die homologe Rekombination zwischen einem linearen DNS-Fragment und dem zirkulären viralen Genom.

Das Kanamycin-Resistenzgen (kan^R) aus dem Vektor pKD13 wurde zusammen mit flankierenden „FLP-recognition target-Sites“ („FRT-Sites“) mittels PCR amplifiziert und durch die Primer zusätzlich mit viralen, flankierenden Sequenzen versehen. Das aufgereinigte PCR-Produkt (3.2.3.2) wurde durch Elektroporation in die Bakterien transformiert (3.2.4.4). Durch die erworbene Kanamycin-Resistenz konnten Bakterien mit mutagenisiertem BAC bei 30°C selektiert werden. Anschließend wurde die Temperatur auf 37°C erhöht, um das temperatursensitive Rekombinationsplasmid pKD46 zu eliminieren. Um kan^R wieder zu entfernen, wurden die elektrokompenten Bakterien mit dem ebenfalls temperatursensitiven Plasmid pCP20 („FLP expression plasmid“) transformiert.

pCP20 kodiert für eine Hefe-Rekombinase, die spezifisch mit den FRT-Sequenzen interagiert und dadurch zum Verlust des Resistenzgens führt. Durch Verlust der Fremdgene ist es möglich, das Genom erneut zu mutagenisieren und Doppelmutanten herzustellen. Abbildung 5 zeigt die nach Eliminierung des Fremdgens verbleibende Fremdsequenz mit einer Länge von 82 bp.

Bei 30°C wurden die transformierten Bakterien nun auf Ampicillin selektiert und nach Temperaturerhöhung auf 37°C auf verschiedene Antibiotika-Resistenzen getestet. Der *E. coli*-Stamm BW25141 mit dem als BAC vorliegenden, viralen Genom des EHV-1-Stammes Rach (pRach) wurde von N. Osterrieder und J. Rudolph zur Verfügung gestellt (RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002; RUDOLPH et al., 2002).

<i>Priming site 1</i>	<u>FLP recognition target site</u>	<i>Priming site 4</i>
gtgtaggctggagctgcttc	gaagttcctatactttctagagaataggaacttcgaactgca	ggtcgacggatccccggaat

Abbildung 5: Verbleibende Fremdsequenz nach FLP-vermittelter Exzision des kan^R

3.2.4.2 Amplifizierung und Aufreinigung linearer Rekombinationssequenzen

Mittels PCR wurde ein Resistenzgen für Kanamycin zusammen mit flankierenden „FRT-Sites“ auf Basis des Template-Vektors pKD13 amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer zeigt die Tabelle 2. Sie enthalten zusätzlich virale Sequenzen, die der homologen Rekombination zwischen dem viralen BAC-Genom und dem PCR-Produkt dienen.

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte (3.2.3.2) wurde die DNS in 100 µl A. dest. gelöst, mit 200 µl absolutem Ethanol und 10 µl 3 M Na-Acetat vermengt und umgefällt.

Die DNS wurde bei 13.000 rpm für 30 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) pelletiert und zweimal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 30 min, 4°C; Kühlzentrifuge Sigma 202MK) wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl A. dest. aufgenommen.

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur T _m
ul43delredup	5' - ATG TGA ATT CAC CGA CGT TAG AAG CAA TAT GCT ATA CAG TCG TTG TTA TTA CTA ATT GGC ATG TTT AGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC - 3'	> 75 °C
ul43delredlow	5' - ATC CTC TTG GGT CCC TGT ACC TCA AAC TCT CCA AAG GTT GGC TTG CTA CAT CAA GGT TAT CAA TCA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C - 3'	> 75 °C

Tabelle 2: Darstellung der für die BAC-Mutagenese verwendeten Primer

3.2.4.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien für die Elektroporation

Eine 2 ml-ÜNK des BW25141-*E. coli*-Stammes wurde in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 geschaukelt. Nach Zugabe von 0,1 % Arabinose, die die Expression der von dem pKD46-Plasmid kodierten Rekombinase induziert, wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 weitergeschaukelt. Nach einer Verweildauer von 15 min auf Eis wurde die Bakterienkultur bei 3.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem A. bidest. resuspendiert und erneut bei 3.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Bakterienpellets in eiskaltem A. bidest. mit 10 % Glycerol und jeweils anschließender Zentrifugation bei 3.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit aufgenommen. Die Bakterienlösung wurde zu je 50 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert. Alle verwendeten Materialien und Flüssigkeiten waren vorgekühlt.

3.2.4.4 Transformation durch Elektroporation

Ungefähr 100 ng des aufgereinigten PCR-Produktes (3.2.4.2) wurden vorsichtig mit einer Portion elektrokompetenter Bakterien auf Eis vermengt. Der Ansatz wurde ohne Luftblasen in eine eiskalte Küvette gefüllt und Hochspannungsimpulsen mit einer Spannung von 2,5 kV bei einem Widerstand von 400 Ω und einer Kapazität von 250 μ F ausgesetzt. Danach wurde die Suspension mit 600 μ l vorgewärmtem SOG-Medium aus der Küvette gespült und für eine Stunde bei 30°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf LB-Nährbodenplatten mit Kanamycin-Zusatz ausgestrichen und bei 30°C bebrütet. Nach ein bis zwei Tagen wurden gewachsene Kolonien gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin-Zusatz ÜN vermehrt.

3.2.4.5 Isolierung von BAC-DNS aus Bakterien

Eine 10 ml-ÜNK der selektierten Bakterien wurde bei 3.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 200 μ l Resuspensionspuffer (Qiagen-Puffer 1) aufgenommen und die Bakterien durch Zugabe von 400 μ l Lysispuffer (Qiagen-Puffer 2) zerstört. Nach fünfminütiger Inkubationszeit auf Eis wurde die Lyse durch Zugabe von 300 μ l Neutralisationspuffer (Qiagen-Puffer 3) gestoppt und der Ansatz erneut 5 min auf Eis gelagert. Nach 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß gefüllt. Mit 900 μ l Phenol-Chloroform 1:1 wurde die DNS-Lösung 50mal geschwenkt und für 15 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß gefüllt und 1:1 mit Isopropanol vermischt und geschwenkt. Bei 13.000 rpm für 20 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) wurde die DNS pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) zentrifugiert. Die getrocknete DNS wurde in 30 μ l A. dest. aufgenommen und bei -20°C gelagert. Mittels Restriktionsenzymverdau (3.2.3.4) und anschließendem Southern Blot (3.2.3.6) wurde die BAC-DNS kontrolliert.

Zur Isolierung größerer Mengen BAC-DNS wurde das Protokoll für low-copy-Plasmide des Qiagen Plasmid Midi Kits verwendet.

3.2.4.6 Eliminierung der Sequenz des Mini F Plasmids pH_{A2}

Das für das Glycoprotein 2 kodierende Gen 71 ist bei dem als BAC klonierten pRacH durch eine GFP-Kassette ersetzt worden. Zur Reinsertion dieses Gens wurden Rk13-Zellen mit der mutagenisierten BAC-DNS (pRacH Δ 43) und dem Plasmiden pt71H kotransfiziert (3.2.1.6). Dieses Plasmid enthält den vollständigen Leserahmen für das Gen 71 des EHV-1-Stammes RacH mit flankierenden homologen Sequenzen. Die Zellen wurden bei 5 % CO₂ inkubiert und nach drei bis fünf Tagen zur Freisetzung intrazellulärer Virionen zweimal gefriergetaut (-70°C/RT). Die Viruslösung wurde anschließend in Verdünnungsschritten auf 90 bis 100 % konfluente Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten gegeben, nach 90 min bei 37°C durch Methylzellulose ersetzt und die Platten bis zur Bildung gut sichtbarer Plaques (drei bis vier Tage) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die gebildeten Plaques wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Diejenigen, die die pH_{A2}-Sequenzen einschließlich des GFP-Gens verloren hatten, fluoreszierten nicht mehr und wurden isoliert. Über eine dreistufige Einzelplaqueisolierung konnte eine phänotypisch GFP-negative Viruspopulation gewonnen werden.

3.2.5 Charakterisierung rekombinanter Viren *in vitro*

3.2.5.1 Einschnitt-Wachstumskinetik

Auf konfluenten Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten wurden die Wachstumseigenschaften des rekombinanten Virus untersucht. Die Zellen wurden für 30 min bei 4°C gekühlt, einmal mit kaltem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und anschließend mit RacH und H Δ 43 (5 PbE pro Zelle) infiziert. Zur Adsorption der Viren wurden die Platten für eine Stunde bei 4°C gelagert. Zur Einleitung der Penetration wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, mit warmem Zellkulturmedium überschichtet und für 90 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung nicht penetrierter Viren wurde das Medium durch Zitrat-Puffer ersetzt und für 2 min auf den Zellen belassen. Nach dreimaligem Waschen mit Medium wurden die Zellen bei 37°C mit Zellkulturmedium bebrütet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 12, 24 und 30 h) wurden die Überstände abgenommen, die Zellen in 1 ml frisches Medium geschabt und beides bis zur Ermittlung der Infektiosität durch Titration (3.2.2.3) bei -70°C gelagert.

3.2.5.2 Wachstumskinetik auf polarisierten Zellen

Um die Wachstumseigenschaften von Viren auf polarisierten Zellen untersuchen zu können, wurde das Transwell®-Filtersystem genutzt, bei dem die Zellen auf speziellen Filtern kultiviert werden (Abb. 6). Hierdurch wird der Zugang sowohl zur apikalen als auch zur basolateralen Zelloberfläche ermöglicht.

Auf die verwendeten Filter (Polyester-Membran für Rk13-Zellen, Polycarbonat-Membran für MDCK-Zellen) mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$ wurden Zellen gesät und bei 37°C bis zur gewünschten Zellrasendicke kultiviert.

Der Polarisationsgrad des Zellrasens wurde zum einen durch tägliche Beobachtung des Mediumstandes kontrolliert. Nach Ausbildung von Zell-zu-Zell-Verbindungen blieb die Mediumsäule des inneren („upper“) Kompartiments konstant, da kein Mediumaustausch von oben nach unten mehr möglich war. Zum anderen konnte die transepitheliale Widerstandszunahme als Zeichen für die Auspolarisierung der Zellen gewertet werden. Hierzu wurde täglich mit Hilfe des Millicell®-ERS der transepitheliale Widerstand zwischen dem inneren und äußeren („lower“) Kompartiment gemessen und dokumentiert.

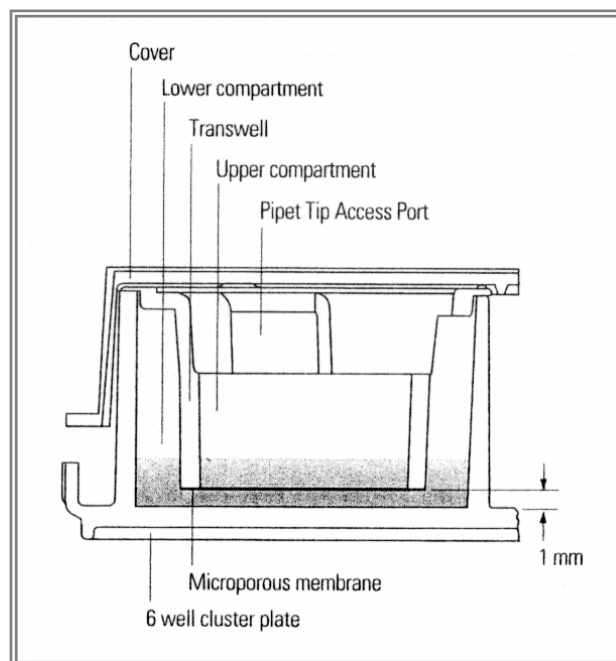


Abbildung 6: Darstellung des Transwell®-Filtersystems

(aus den Herstellerangaben, Corning Incorporated costar®)

Bei vollständiger Polarisierung wurden die Zellen mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und je nach Versuchsaufbau von apikal oder von basolateral mit 2 PbE pro Zelle infiziert. Zur basolateralen Infektion mussten die Filter aus ihrem Well genommen und kopfüber in einer 6-Loch-Platte infiziert werden. Dabei waren Volumina von maximal 250 μl möglich. Nach einer Adsorptionszeit von 90 min wurden die Filter für 2 min mit Zitrat-Puffer behandelt und anschließend dreimal mit Medium gewaschen. Nach Überschichtung mit Medium und 5 % FKS wurden die Zellen bei 37°C kultiviert und zu bestimmten Zeiten Über-, Unterstand und Zellen gewonnen. Dabei wurden die Zellen erneut mit Zitrat-Puffer behandelt, dreimal mit Medium gewaschen und mit dem Filter in 1 ml Medium verbracht. Die erhaltenen Proben wurden bei -70°C gelagert.

Zur Ermittlung der entstandenen Infektiositäten wurden die Über-, Unterstände und Zellen auf Rk13-Zellen wie in 3.2.2.3 beschrieben titriert und die Ergebnisse dokumentiert.

3.2.5.3 Plaquegrößenvergleich

Zur Bestimmung der Plaquegrößen rekombinanter Viren wurden konfluente Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten mit 100 PbE pro Loch infiziert. Dazu wurden die Zellen für 60 min bei 37°C mit der Virussuspension inkubiert und nach Abnahme des Überstandes mit Methylzellulose überschichtet. Bis zur Bildung gut sichtbarer Plaques (drei bis vier Tage) wurden die Zellen unter CO_2 -Atmosphäre bebrütet. Nach Abnahme der Methylzellulose wurden die Plaques mit einer Kristallviolett-Färbelösung fixiert und angefärbt. Der Durchmesser der Plaques wurde mit Hilfe eines computergestützten Messprogramms (SPOT Advanced Software, Diagnostic Instruments) ermittelt und aus je 100 Plaques der Mittelwert bestimmt.

3.2.5.4 Vergleich der Penetrationsfähigkeit

Zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften rekombinanter Viren wurden konfluente Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten für 30 min bei 4°C gekühlt und für die weiteren Schritte auf Eis gelagert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden die Zellen mit 100 PbE pro Loch des entsprechenden Virus überschichtet und für 90 min bei 4°C zur Adsorption der Viren inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden nicht adsorbierte Viren entfernt und die Penetration durch Zugabe von 37°C warmem Medium eingeleitet. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten (0, 10, 20, 40, 60 und 80 min) die noch nicht penetrierten Viren durch zweiminütige Behandlung mit Zitrat-Puffer inaktiviert.

Durch dreimaliges Waschen mit Medium wurden Reste des Zitrat-Puffers entfernt, die Zellen mit Methylzellulose überzogen und bis zur Ausbildung gut sichtbarer Plaques (drei bis vier Tage) bei 37°C unter CO₂-Atmosphäre bebrütet. Die Zellen wurden mit Kristallviolett-Färbelösung fixiert und gefärbt, die Anzahl der Plaques zu den jeweiligen Zeitwerten ermittelt und in Relation zur Kontrolle ohne Zitratbehandlung gesetzt.

3.2.6 Expression und Aufreinigung des UL43-Proteins von EHV-1 in Bakterien

3.2.6.1 Expression

Zur Expression des UL43-Homologs wurde das Glutathion S-Transferase (GST)-System verwendet. Mittels PCR wurden die ersten 148 Basenpaare und ein 308 bp umfassendes Fragment ab dem 564. Bp des UL43-Leserahmens aus viraler DNS amplifiziert und in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 (3.2.3.5) kloniert. In diesem Plasmid stehen die inserierten Gene unter der Kontrolle eines durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren Promotors. Die exprimierten Polypeptide bilden mit dem GST-tag des Vektors Fusionsproteine, die mittels anti-GST-Antikörper detektiert werden können.

Die Plasmide wurden in TOP10-Bakterien transformiert (3.2.3.7) und die Expression der rekombinanten Proteine durch IPTG induziert. Dazu wurden 50 ml einer ÜNK gepickter Kolonien 1:10 in LB-Medium verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bei 37°C vermehrt, mit 2 mM IPTG induziert und für weitere 6 h bei 37°C geschaukelt. Durch 10minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) wurden die Bakterien pelletiert und das Pellet bei -20°C eingefroren. Zur Kontrolle der Expression wurde vor und 6 h nach der Induktion je 1 ml Aliquot entnommen, für 2 min bei 8.000 rpm bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 202MK) pelletiert, in 150 µl 8 M Harnstoff aufgenommen und bei -20°C gelagert. Als Kontrolle wurde der leere Vektor transformiert und die Expression induziert.

Im Western Blot (3.2.8.1.3) wurde dann mit Hilfe des anti-GST-Antikörpers die Expression der rekombinanten Proteine im Gegensatz zur Kontrolle detektiert.

3.2.6.2 Aufreinigung

Affinitätschromatographie

Das bei -20°C gelagerte Bakterienpellet wurde in 20 ml kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,1 % Triton X-100 und 20 mg Lysozym aufgenommen und für eine Stunde auf Eis geschaukelt. Die Bakterienlösung wurde mit Ultraschall behandelt (achtmal für 20 s auf Eis) und bei 12.000 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden zu dem, von Bakterienresten gereinigten Überstand (Aliquot 1) 1,3 ml Glutathion Sepharose® 4B-Beads gegeben, die zuvor zweimal mit 15 ml kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und jeweils bei 1.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) abzentrifugiert worden waren. Das Bakterienlysate wurde ÜN mit den Beads und 5 mM Dithiothreitol (DTT) bei 4°C geschaukelt. Am nächsten Morgen wurden die Glutathion Sepharose® 4B-Beads mit dem gebundenen Protein bei 1.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) abzentrifugiert, mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} für 10 min bei 4°C geschaukelt und erneut zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrilles (Aliquot 2-5) wurden die Beads in 5 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 10 mM Glutathion) ÜN bei 4°C geschaukelt, um das gebundene Fusionsprotein zu lösen. Die Sepharose-Beads wurden bei 1.500 rpm für 10 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) abzentrifugiert, um das eluierte Protein aus dem Überstand zu gewinnen (Aliquot 6). In zwei weiteren Elutionsschritten mit je 2,5 ml Elutionspuffer und jeweiliger Abzentrifugation wurde das noch gebundene Protein gelöst (Aliquot 7+8). Die gewonnenen Aliquots wurden bei -20°C gelagert und in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf ihren Proteingehalt analysiert.

Dialyse

Die verschiedenen Elutionsüberstände wurden zur Renaturierung des Proteins in Dialyseschläuche Spectra/Por® gefüllt, deren Porengröße so gewählt wurde, dass Proteine mit einem Molekulargewicht von über 8.000 Dalton (Da) nicht nach außen diffundieren konnten. Die befüllten Schläuche wurden ÜN bei 4°C in PBS inkubiert, das nach 24 h durch PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ersetzt wurde. Der teilweise ausgefallene Inhalt der Dialyse-Schläuche wurde bei 2.000 rpm für 20 min bei 4°C (Kühlzentrifuge Sigma 4K10) abzentrifugiert, das pelletierte Protein und der Überstand, der gelöstes Protein enthielt, gewonnen und in Verdünnungen von 1:10 bis 1:1.000 in ein Polyacrylamidgel eingesetzt.

Durch Färbung des Gels mit Coomassie-Färbelösung und anschließender Entfärbung mit Coomassie-Entfärber (3.2.8.1.2) konnte die Konzentration des aufgereinigten Proteins abgeschätzt und dessen Reinheit bestimmt werden. Im Western Blot wurde das Protein mit dem anti-GST-Antikörper detektiert.

3.2.7 Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung

Um ein polyklonales Kaninchenserum mit spezifischen Antikörpern gegen das UL43-homologe Protein von EHV-1 zu gewinnen, wurden Kaninchen alle drei Wochen mit je 50 bis 100 µg der bakteriell exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteine immunisiert. Die gewonnenen Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit Freund'schem Adjuvans bis zur Entstehung einer Emulsion für 10 min gevortext und den Tieren in die Oberschenkelmuskulatur appliziert. Den Kaninchen wurden vor der ersten und ab der dritten Immunisierung jeweils 10 Tage danach einige Milliliter Blut an der Ohrvene entnommen. Das gewonnene Blut wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und für 10 min bei 1.000 rpm (Stockzentrifuge) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abgenommen und in Portionen zu je 500 µl bei -70°C gelagert.

3.2.8 Proteine

3.2.8.1 Proteinanalyse mittels Elektrophorese

3.2.8.1.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE lagern sich die stark negativ geladenen SDS-Moleküle an die Polypeptidketten an und bewirken deren Denaturierung und negative Ladung. Dadurch wird die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nicht mehr durch ihre elektrische Ladung sondern durch ihr Molekulargewicht bestimmt. Zur Herstellung der Gele und Durchführung der Elektrophorese wurde das Vertikalelektrophorese-System Mini-Protean II verwendet.

Herstellung der Gele

Die Gele bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel, deren Porengröße und Bereich der optimalen Auftrennung durch die Acrylamidkonzentration variiert werden kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Tris-Glycin-Puffersystem v. a. Trenngele mit 12 % Acrylamid verwendet. Außerdem enthielten die Gele A. dest., Tris-Puffer, SDS, Ammoniumpersulfat (Amper) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Tab. 3).

Die gereinigte Apparatur wurde mit 70 %igem Alkohol entfettet und nach Herstellerbeschreibung zusammengebaut. Das angemischte Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gefüllt und zur Aushärtung unter Luftabschluss mit A. dest. überschichtet. Auf das gehärtete Trenngel wurde das Sammelgel gefüllt, das mit einem Kamm mit Vertiefungen für die einzufüllenden Proben versehen wurde. Der Kamm wurde nach Aushärten des Sammelgels entfernt und die Vertiefungen mit Elektrophoresepuffer gereinigt.

Trenngel	12 %	Sammelgel	3 %
A. dest.	2,54 ml	A. dest.	1,85 ml
Tris-Puffer 1,5 M, pH 8,8	1,90 ml	Tris-Puffer 0,5 M, pH 6,8	0,75 ml
SDS, 20 %	37,5 µl	SDS, 20 %	15,0 µl
Acrylamidstammlsg., 30 %	3,03 ml	Acrylamidstammlsg., 30 %	0,40 ml
Amper, 10 %	37,5 µl	Amper, 10 %	22,5 µl
TEMED	3,75 µl	TEMED	3,75 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Vorbereitung der Proben

Die nach 3.2.1.3 hergestellten Zellysate wurden mit Probenpuffer für Glycin-PAGE versetzt, auf Eis belassen oder für 5 min gekocht und in die Aussparungen des Sammelgels eingefüllt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte im Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 100 V für 1,5 bis 2,5 h.

3.2.8.1.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau

Zur Darstellung der bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine und deren Konzentrationsbestimmung nach Aufreinigung wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau R-250 gefärbt. Dazu wurden die Polyacrylamidgele nach Elektrophorese für 30 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend für mindestens zwei Stunden in Coomassie-Entfärber geschaukelt. Beim Entfärben löste sich der blaue Farbstoff aus dem Gel nicht aber aus den im Gel enthaltenen Proteinbanden, die somit als blaue Banden sichtbar wurden. Zur Konservierung wurden entfärbte Gele auf Chromatographiepapier 3MM gelegt, mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei 80°C im Geltrockner Biometra® getrocknet.

3.2.8.1.3 Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen (Western Blot)

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden mittels Immundetektion, müssen diese zuerst auf einer Nitrocellulose Protran BA83- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfer-Membran fixiert werden. Beim Tankblotverfahren (TOWBIN et al., 1979) werden die elektrophoretisch aufgetrennten und durch SDS negativ-geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld aus dem Trenngel auf eine Membran gezogen.

Hierzu wurden sowohl die Membran als auch das Polyacrylamidgel für 10 min in Towbin-Puffer äquilibriert und blasenfrei aufeinander gelegt. PVDF-Membranen wurden vor Verwendung mit absolutem Methanol, dann mit A. dest. und schließlich mit Towbin-Puffer gewässert. Als Schutz wurden auf beide Seiten in Towbin-Puffer getränktes Chromatographiepapier 3MM und Schwämmchen angelegt und das Ganze entsprechend den Herstellerangaben in eine Mini-Trans-Blot-Apparatur eingespannt. Die Kammer wurde mit kaltem Towbin-Puffer und einem Kühlakku versehen und für 65 min eine Gleichspannung von 100 V angelegt.

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für zwei Stunden in TBS-T-Puffer mit 10 % Magermilchpulver bei RT geschaukelt. Die Membran wurde ÜN bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (monoklonaler Antikörper in TBS-T-Puffer, polyklonales Antiserum in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 30 min bei RT in TBS-T-Puffer gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde das anti-Spezies POD-Konjugat in einer 1:1.000 Verdünnung in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer auf die Membran gegeben.

Nach einer Stunde wurde überschüssiges Konjugat durch dreimaliges Waschen für je 30 min in TBS-T-Puffer entfernt und die Membran mit ca. 1 ml nach Herstellerhinweis gemischtem ECL-Reagenz in Folie eingeschweißt. Mit einem Röntgenfilm, der für mindestens 10 min aufgelegt und anschließend entwickelt wurde, konnte die Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

3.2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Die Lokalisation von Proteinen in Zellen konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz beobachtet und nachgewiesen werden. Dabei wurden Zellen auf Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät und je nach Experiment transfiziert, infiziert oder zur Untersuchungen mit Polarisationsmarkern für einen bestimmten Zeitraum kultiviert. Zur Fixation wurde der Zellrasen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und für 15 min bei RT mit 2 %igem Paraformaldehyd (PFA) überschichtet.

Nach Abnahme des PFA wurden die Zellen dreimal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Durch Zugabe von PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 0,1 % Triton X-100 für 15 min bei RT wurde die Zellmembran zerstört und intrazelluläre Strukturen zugänglich gemacht. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 3 % FKS geblockt. Nach 60 min wurden Kaninchenserum oder monoklonale Antikörper in ihrer jeweils optimalen Verdünnung in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 3 % FKS für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Durch dreimaliges Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden Reste des ersten Antikörpers entfernt und daraufhin die Zellen mit dem sekundären Antikörper (anti-mouse „Alexa“ oder anti-rabbit „Alexa“, R488/R546) in dessen jeweiliger Verdünnung in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 3 % FKS beschickt. Das nicht gebundene Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} entfernt und die trockenen Deckgläschen auf einem Tropfen PBS/Glycerin (1:1) auf Objektträgern mit Klarlack fixiert. Die indirekte Immunfluoreszenz konnte im Konfokalen Laserscan- oder im Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden.

4. Ergebnisse

4.1 Die Charakterisierung des EHV-1 UL43-Produktes

4.1.1 Die Herstellung rekombinanter Plasmide

Vom Plasmid p9A1, das das *Bam*HI-„h“-Fragment des EHV-1-Genoms enthält, wurden mittels PCR drei unterschiedliche Abschnitte des UL43-Leserahmens amplifiziert (Abb. 7) und über die gewählten Primer Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme angefügt.

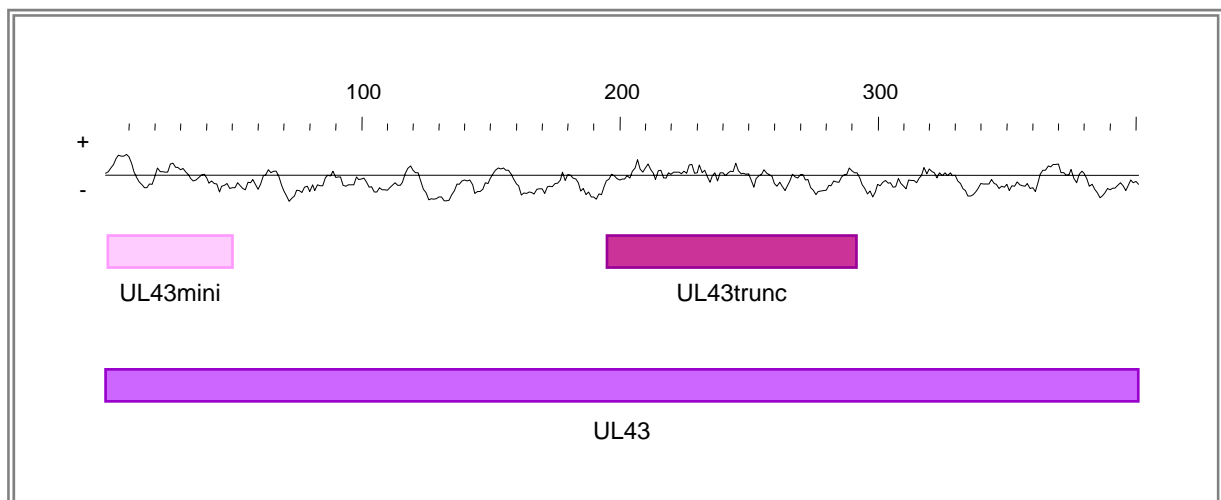


Abbildung 7: Kyte-Doolittle Hydrophobizitätsplot des UL43-Polypeptides

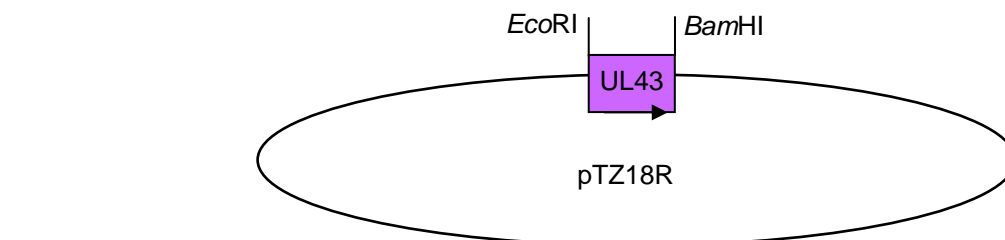
Mittels PCR wurden Abschnitte des UL43-Leserahmens amplifiziert, die für die als Balken dargestellten Bereiche des Polypeptides kodieren. Das gesamte UL43-Polypeptid ist in einem Hydrophobizitätsplot dargestellt (Husar, GCG Softwarepackage, Heidelberg).

Das den gesamten 1.205 bp UL43-ORF umfassende Amplifikat wurde über *Eco*RI und *Bam*HI sowohl in den Vektor pTZ18R als auch in die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 eingefügt. Hierbei entstanden die Plasmide pt43, pGFPC43 und p43NGFP. In pGFPC43 bzw. p43NGFP wurde das UL43-Gen jeweils so fusioniert, dass ein C-terminales bzw. ein N-terminales Green Fluorescent Protein (GFP)-UL43-Fusionsprotein exprimiert werden konnte.

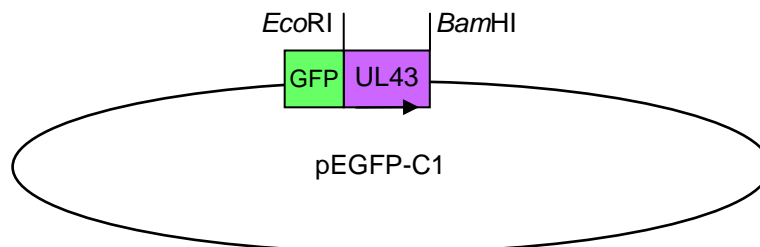
Die beiden anderen PCR-Produkte waren das 148 bp umfassende UL43mini und das 308 bp große UL43trunc (Abb. 7) mit den jeweils angefügten Erkennungssequenzen für *EcoRI*/*HindIII* bzw. *KpnI*/*XbaI*. Das PCR-Produkt UL43mini wurde mittels *HindIII* (gebluntet) und *EcoRI* an *XhoI* (gebluntet) und *EcoRI* in den Vektor pGEX-4T-1 eingefügt. Hierbei entstand das Plasmid pG43mini.

Das Amplifikat UL43trunc wurde über die Restriktionsenzymschnittstellen für *KpnI* und *XbaI* in den Vektor pBAD/gIIIa eingefügt. Das entstandene Plasmid wurde pBAD43t genannt. Anschließend wurde das UL43trunc-Fragment mit *PstI* (gebluntet) und *SaI* aus dem Vektor pBAD43t geschnitten und zwischen die Schnittstellen für *SaI* (gebluntet) und *XhoI* des Vektors pGEX-4T-1 gesetzt. Es entstand das Plasmid pG43t.

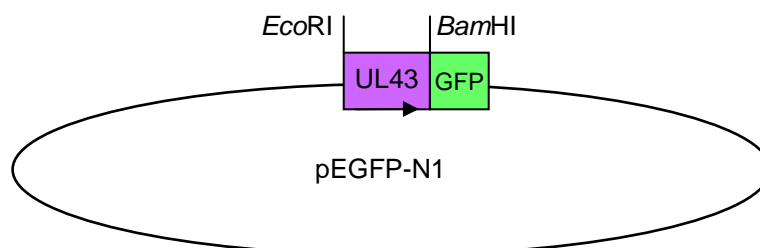
In Abbildung 8 sind die gebildeten Plasmide schematisch dargestellt.



pt43



pGFPC43



p43NGFP

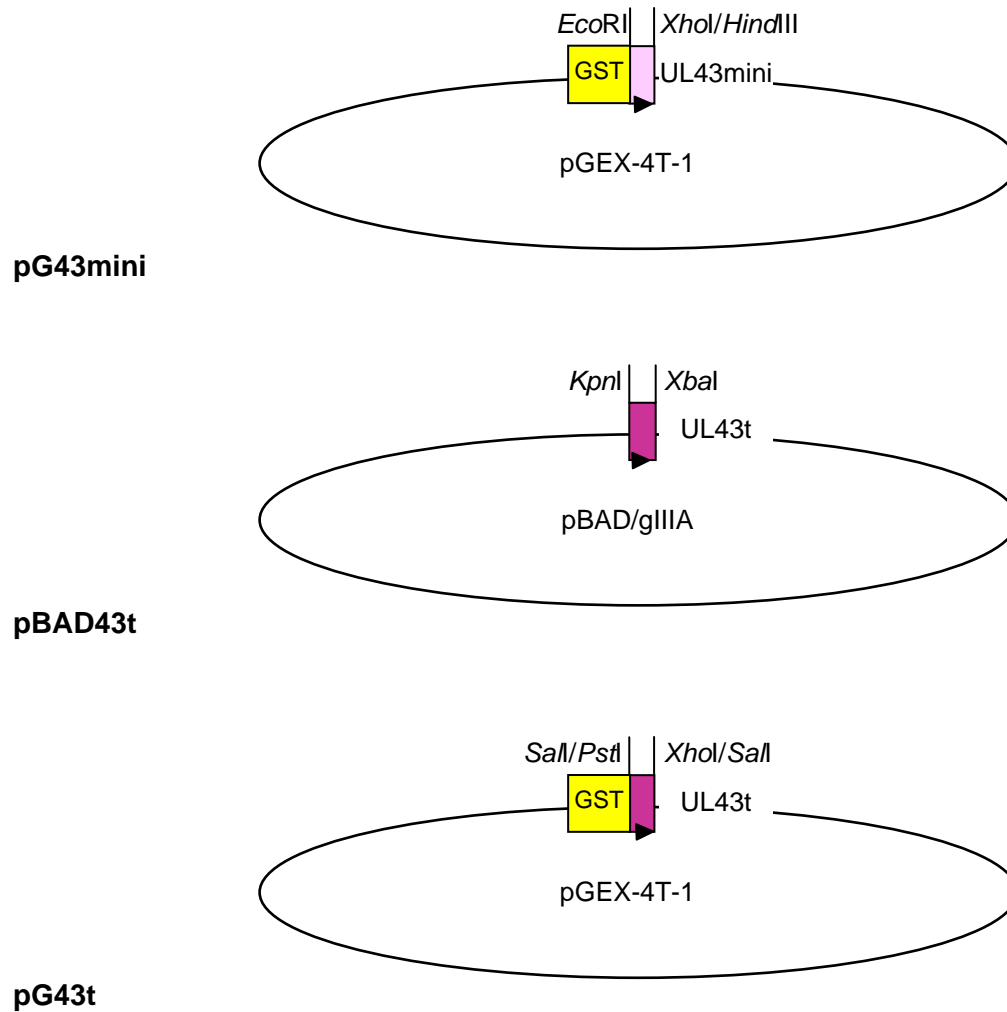


Abbildung 8: Schematische Darstellung der rekombinanten Plasmide

Die Größenverhältnisse der abgebildeten Plasmide sind nur tendenziell wiedergegeben.

4.1.2 Die Herstellung einer UL43-exprimierenden Zelllinie

Zur Untersuchung der UL43-Expression in eukaryotischen Zellen wurde eine Zelllinie generiert, die das gesamte UL43-Polypeptid mit GFP-Fusion stabil exprimiert. Dazu wurden Rk13-Zellen mit dem Plasmid pGFPC43 transfiziert. Der gewählte Vektor trägt das bakterielle Gen *neo^r*, dessen Produkt Geniticin durch Phosphorylierung inaktiviert. Dadurch wird eine Selektion auf transfizierte Zellen mittels G-418 ermöglicht. Zusätzlich trägt das erzeugte Plasmid das Gen für GFP, das mit dem inserierten UL43-Gen fusioniert vorliegt. Die stabile Expression des GFP-UL43-Fusionsproteins (GFPC43) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert und exprimierende Zellklone isoliert. Es entstand die GFPC43-exprimierende Zelllinie TCGFPC43.

4.1.3 Die Charakterisierung des UL43-Proteins

4.1.3.1 Die Immunisierung von Kaninchen mit UL43-spezifischen Polypeptiden

Um das UL43-Produkt detektieren zu können, wurde versucht ein UL43-spezifisches polyklonales Antiserum zu gewinnen.

Dazu wurden zum einen die ersten 148 bp des UL43-Leserahmens als „UL43mini“ und zum anderen 308 bp zwischen dem Basenpaar 564 und 872 des UL43-Leserahmens als „UL43trunc“ in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert (Abb. 7 und 8). Innerhalb dieses Vektorsystems wird das Insert mit der Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert, so dass das entstehende Fusionsprotein mit einem anti-GST-Antikörper detektiert werden kann. Nach bakterieller Expression beider Fusionsproteine (GST43mini und GST43trunc) durch einen IPTG-induzierbaren Promotor waren diese mit Hilfe eines anti-GST-Antikörpers im Western Blot nachzuweisen (Abb. 9). Mit den durch Affinitätschromatographie aufgereinigten Polypeptiden wurden Kaninchen immunisiert und Seren gewonnen. Trotz vieler verschiedener Ansätze konnte jedoch weder im Western Blot noch in der indirekten Immunfluoreszenz eine spezifische Reaktivität der Seren festgestellt werden.

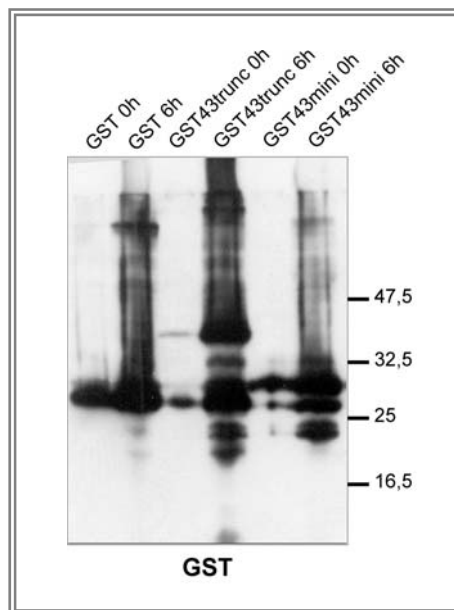


Abbildung 9: Western Blot - Bakterielle Expression von Teilbereichen des UL43-Polypeptids

Um die Expression des reinen GST und der beiden Fusionsproteine GST43mini und GST43trunc vergleichend darzustellen, wurden jeweils Aliquots des 0 h- und 6 h-Wertes nach Expressionsinduktion eingesetzt und mit anti-GST detektiert. Die GST wurde bei ca. 27 kDa detektiert, die Fusionsproteine entsprechend der Insertgröße; GST43mini bei ca. 28 kDa und GST43trunc bei ca. 39 kDa. Die Größen eines Proteinstandards sind am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

4.1.3.2 Das GFP-UL43-Fusionsprotein (GFPC43) im Western Blot

4.1.3.2.1 Die Identifizierung des GFPC43

Zur Identifizierung des GFPC43, das von der generierten Zelllinie TCGFPC43 stabil exprimiert wird, wurden gewonnene Zelllysate im Western Blot untersucht. Dazu wurden TCGFPC43-Zellen mit RacH (zwei PbE pro Zelle) infiziert oder uninfiziert belassen und 16 h post infectionem (p. i.) Zelllysate gewonnen. Die Lysate wurden für 5 min auf 99°C erhitzt oder auf Eis belassen. Durch das Erhitzen aggregieren stark hydrophobe Proteine, können im Western Blot nicht weiter aufgetrennt werden und bleiben zwischen Sammel- und Trenngel hängen. Mit Hilfe des anti-GFP-Antikörpers konnten reaktive Banden bei ca. 27 kDa, ca. 43 kDa und am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel detektiert werden (Abb. 10).

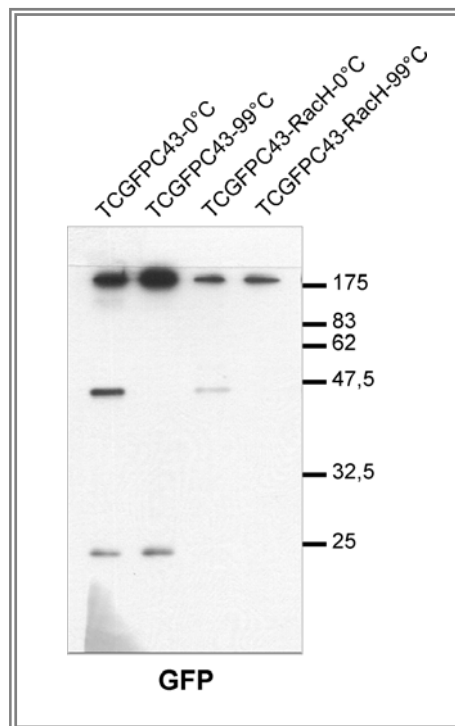


Abbildung 10: Western Blot - TCGFPC43-Zelllysate

Zur Identifizierung des GFPC43, das von der generierten Zelllinie TCGFPC43 stabil exprimiert wird, wurden Zelllysate infizierter und nicht-infizierter Zellen sowohl nach Hitzedenaturierung (99°C) als auch undenaturiert (0°C) im Western Blot eingesetzt. GFP-reaktive Banden wurden mit einem polyklonalen anti-GFP-Serum detektiert. Die Größen eines Proteinstandards sind am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

4.1.3.2.2 Das GFPC43 ist membranassoziiert

Um die Lokalisation des GFPC43 in der Zelle bestimmen zu können, wurden TCGFPC43-Zellen in Fraktionen aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Dazu wurden sowohl nicht-infizierte als auch über 14 h mit RacH infizierte (zwei PbE pro Zelle) TCGFPC43-Zellen verwendet. Die einzelnen Fraktionen, die entweder unter den gegebenen Bedingungen lösliche (zytoplasmatische Fraktion; Z) oder unlösliche (Membranfraktion; M) zytoplasmatische Bestandteile oder Zellkerne (K) mit den ihnen assoziierten Membranen enthielten, wurden nach Bestimmung und Einstellung des Proteingehalts im Western Blot mit dem polyklonalen anti-GFP-Serum und dem monoklonalen gB-Antikörper 3F6 untersucht. Mit Hilfe des anti-GFP konnte das GFPC43 in infizierten und nicht-infizierten Zellen sowohl in der Membran- als auch in der Kernfraktion bei einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa detektiert werden (Abb. 11A). Diese Zuordnung lässt auf eine Membranassoziation des GFPC43 in der Zelle schließen. Ein identischer Blot wurde zusätzlich mit 3F6 untersucht (Abb. 11B), um die Infektion der Zellen und die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu kontrollieren. Als membranassoziiertes Glykoprotein ist gB ebenfalls in der Membran- und der Kernfraktion infizierter Zellen nachweisbar.

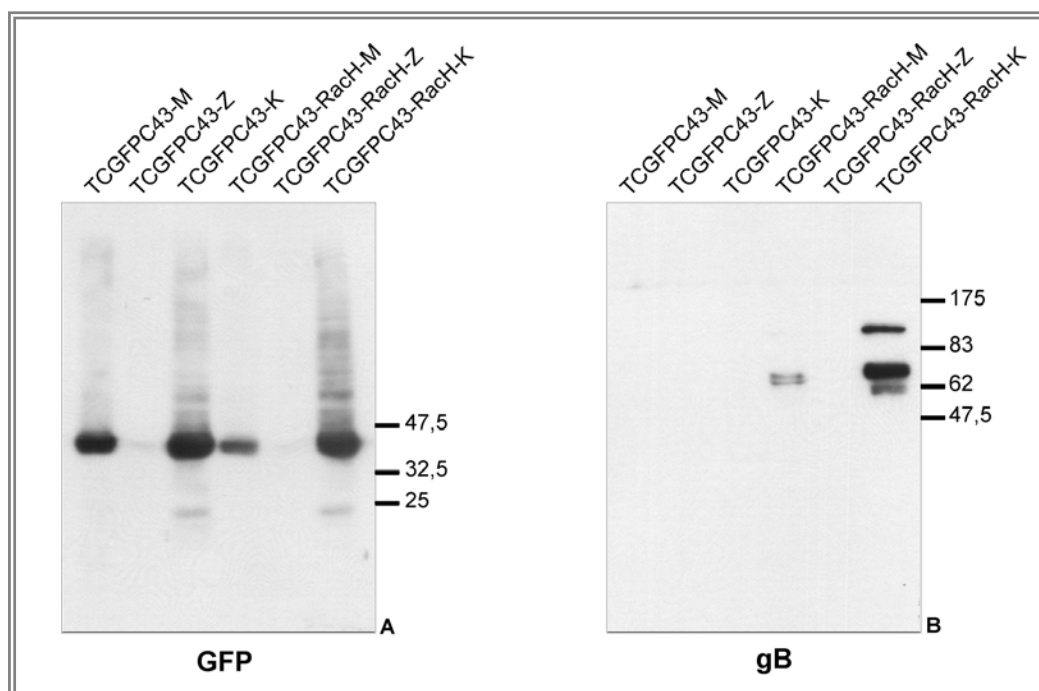


Abbildung 11: Western Blot - Zellfraktionierung der TCGFPC43-Zelllinie

Die Membran- (M), Zytoplasma- (Z) und Kernfraktionen (K) der infizierten und nicht-infizierten TCGFPC43-Zellen wurden im Western Blot eingesetzt und identische Membranen mit anti-GFP- (A) oder anti-gB-Antikörper (B) inkubiert. Die Größen eines Proteinstandards sind jeweils am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

4.1.3.2.3 Das zelluläre GFPC43 wird in extrazelluläre Virionen eingebaut

Um festzustellen, ob das EHV-1 UL43-Protein ein Bestandteil extrazellulärer Virionen ist, musste ein indirekter experimenteller Weg gewählt werden. TCGFPC43-Zellen wurden dazu mit der UL43-Deletionsmutante H Δ 43 (4.1.4) infiziert (zwei PbE pro Zelle) und die gebildeten extrazellulären Virionen nach 16 h aufgereinigt. Das GFPC43 (Abb. 12A) wurde mit Hilfe des polyklonalen anti-GFP-Serums in den extrazellulären Virionen in zwei Formen bei scheinbaren Molekulargewichten von 43 kDa und 100 kDa detektiert. Der monoklonale Antikörper 3F6 reagiert dagegen mit gB (Abb. 12B), das ein Hüllprotein extrazellulärer Virionen ist und nur in seiner reifen Form in diese eingebaut wird. Zur weiteren Bestätigung der Reinheit der präparierten Virionen wurden die polyklonalen Antikörper gegen pUL34 (Abb. 12C) und pUL45 (Abb. 12D) verwendet. Diese viralen Proteine pUL34 und pUL45 kommen in extrazellulären Virionen nicht vor.

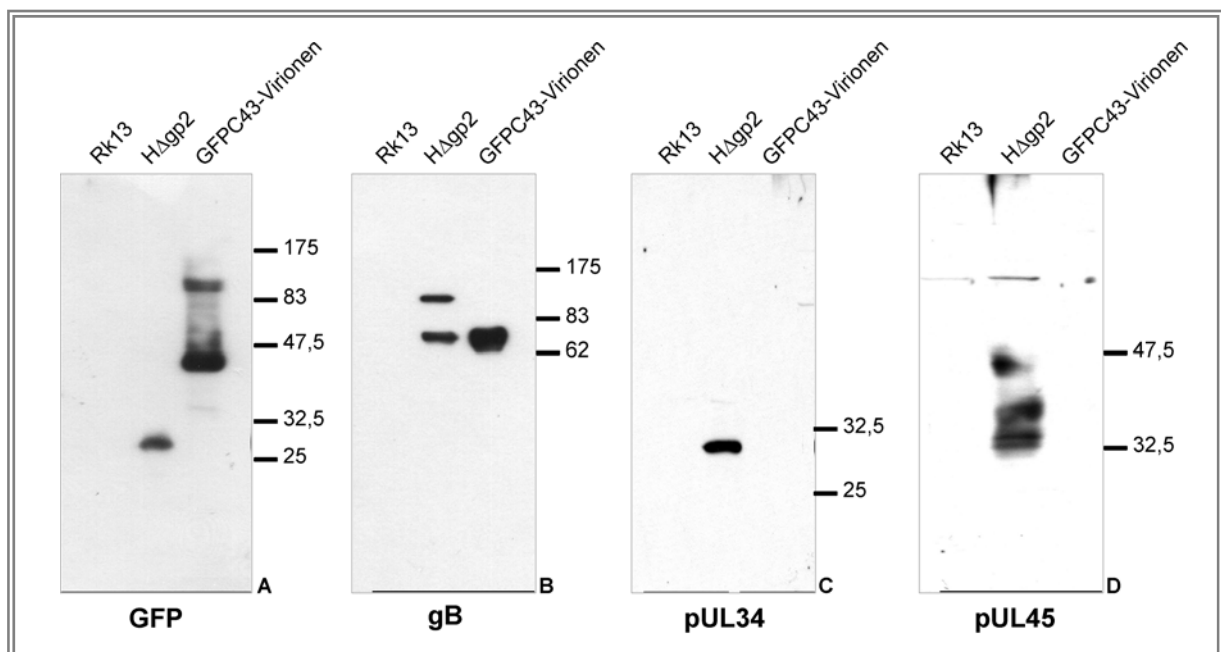


Abbildung 12: Western Blot - Virionenpräparation

Aliquots der präparierten Virionen wurden im Western Blot eingesetzt. Lysate von uninfizierten und mit H Δ gp2, einem rekombinanten, GFP-exprimierenden Virus (RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002), infizierten Rk13-Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Parallel geblottete Membranen wurden mit den GFP- (A), gB- (B), pUL34- (C) und pUL45-Antikörpern (D) inkubiert. Die Größen eines Proteinstandards sind jeweils am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

4.1.3.2.4 Die Untersuchung einer Assoziation des GFPC43 mit Lipid Rafts

Lipid Rafts sind cholesterol- und sphingolipidreiche Domänen zellulärer Membranen, die eine geringe Dichte aufweisen und in Detergentien wie Triton X-100 unter bestimmten Bedingungen unlöslich sind. Unter anderem trifft diese präparative Definition auch auf Proteine der Tight Junctions (TJ) zu, die in Lipid Raft-ähnlichen Domänen angereichert sind (NUSRAT et al., 2000).

Zur Untersuchung einer möglichen Lipid Raft-Assoziation des pUL43 wurden über ein und drei Tage kultivierte TCGFPC43-Zellen mit H Δ 43 (4.1.4) infiziert (drei PbE pro Zelle, 18 h) oder nicht-infiziert belassen. Diese Kultivierungszeiten wurden gewählt, um die Ausprägung der Polarisation der Zellen und somit die Bildung von Zellverbindungsstrukturen mit in die Untersuchung einbeziehen zu können. Nach der Präparation wurden die erhaltenen 14 Fraktionen im Western Blot mit den polyklonalen Antiseren gegen das GFP, das gM, das pUL11, das pUL20 und das pUL34 und den monoklonalen Antikörpern 3F6 (gB) und 20C4 (gD) analysiert. Das bekanntermaßen mit Lipid Rafts assoziierte, zelluläre Protein Flotillin-2 wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers dargestellt.

Flotillin-2-spezifische Reaktivitäten wurden in den Fraktionen 2 bis 4 und 10 bis 14 detektiert. Die in Triton X-100 unlöslichen, mit Lipid Rafts assoziierten Proteine werden dabei in den Fraktionen 2 bis 4 erwartet. Lösliche Proteine sollten dagegen in den Fraktionen 10 bis 14 zu finden sein (Abb. 13A und 13B). Allerdings war in der hier durchgeführten Serie von Experimenten selbst das Flotillin-2 nur zu einem geringen Anteil in den Lipid Raft-assoziierten Fraktionen zu detektieren, was die Auswertung der Ergebnisse erschwerte. Aus diesem Grund können die für die viralen Proteine gemachten Schlussfolgerungen nur als Tendenz betrachtet werden und müssten in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Für die viralen Proteine gD (Abb. 14) und pUL11 (Abb. 14) war eine spezifische Reaktion in den Lipid Raft-Fraktionen erkennbar. Das GFPC43 (Abb. 13A und 13B) war aufsteigend in fast allen Fraktionen vertreten und zeigte keine deutliche Anreicherung in den Lipid Raft-Fraktionen. Unterschiede in der Verteilung des Fusionsproteins und des Flotillin-2 bei weniger (1 d) und stark (3 d) polarisierten TCGFPC43-Zellen konnten nicht festgestellt werden. Weitere virale Proteine wie gM, pUL20, pUL34 und gB (Abb. 14) waren in diesen Experimenten hauptsächlich in den Fraktionen der löslichen Proteine nachzuweisen.

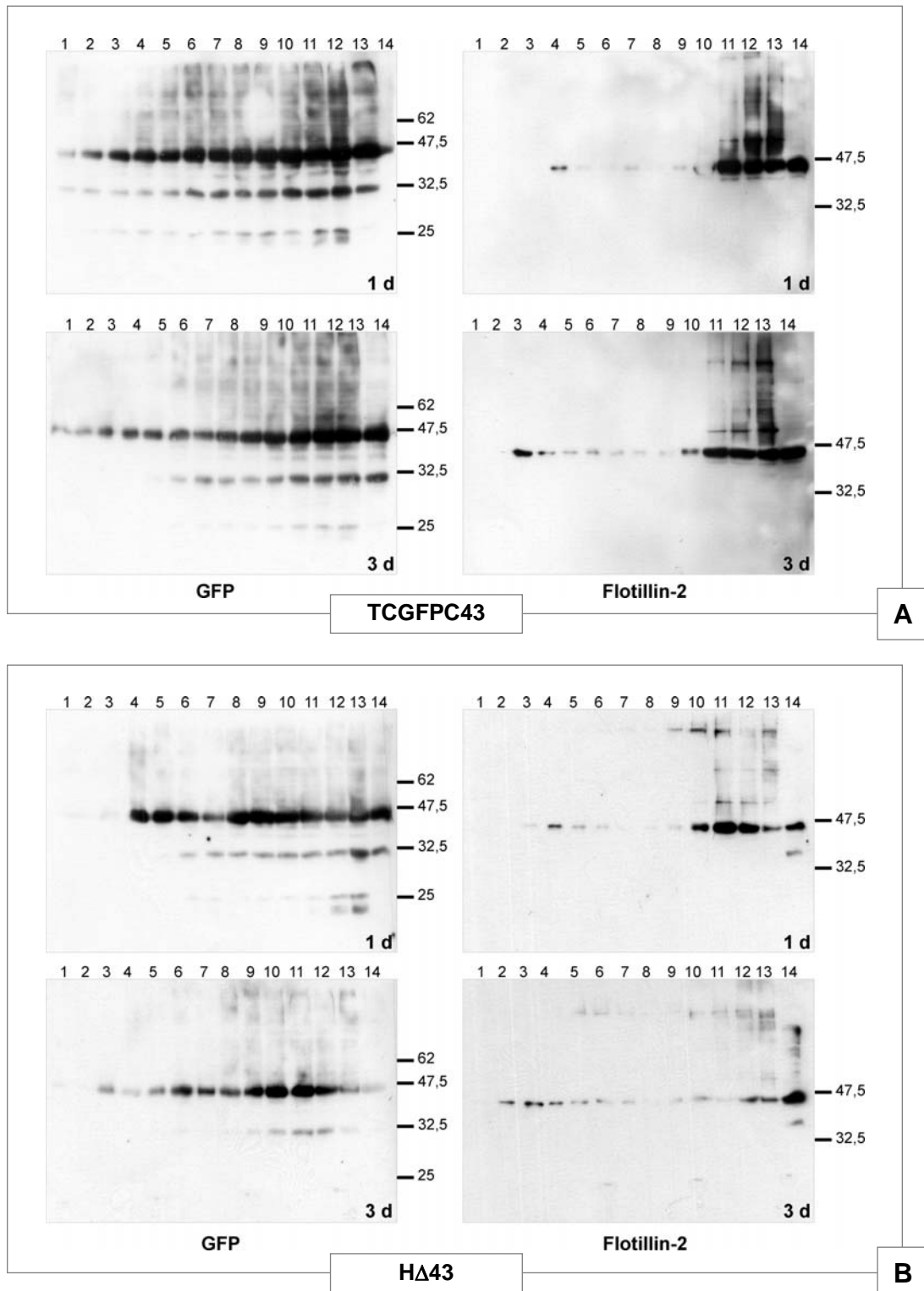


Abbildung 13: Western Blot - Lipid Raft-Assoziation des GFPC43

Lipid Raft-Fraktionen wurden am Tag 1 oder 3 nach Aussaat aus infizierten (B) oder nicht-infizierten (A) Zellen gewonnen. Im Western Blot wurden die Fraktionen der Lipid Raft-Präparation eingesetzt und die Membranen mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine inkubiert. Die Größen eines Proteinstandards sind jeweils am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

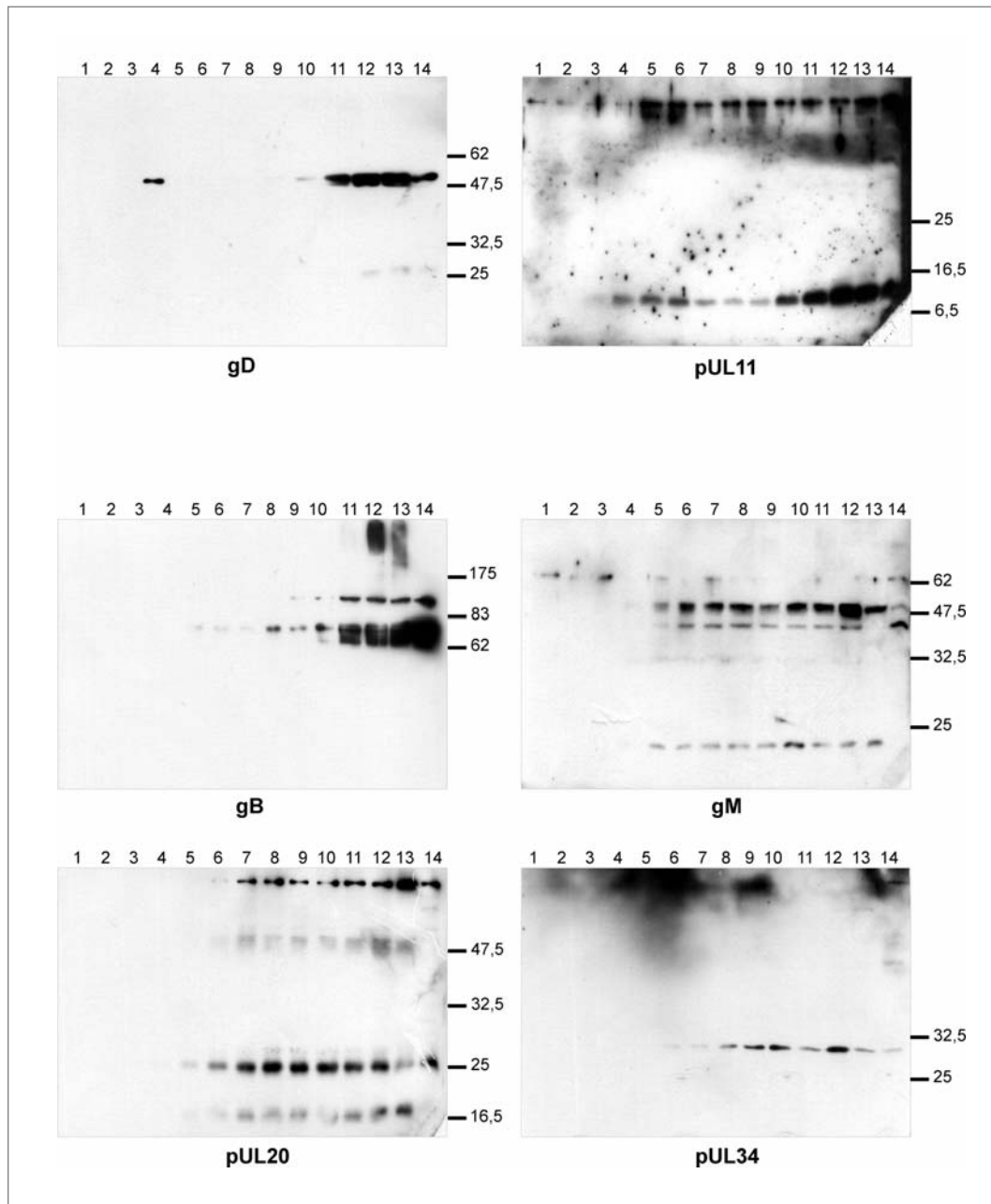


Abbildung 14: Western Blot - Lipid Raft-Assoziation verschiedener EHV-1-Proteine

Aus über einen Tag kultivierten und anschließend infizierten TCGFPC43-Zellen wurden Lipid Raft-Fraktionen gewonnen. Diese wurden im Western Blot eingesetzt und die Membranen mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine inkubiert. Die Größen eines Proteinstandards sind jeweils am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

4.1.3.3 Das GFPC43 in der Fluoreszenz

4.1.3.3.1 Der Vergleich der Verteilung der GFPC43-Fluoreszenz nach Expression verschiedener Konstrukte

Die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des pUL43 wurde durch die Expression mit verschiedenen Markern versehener UL43-Fusionsproteine ermöglicht. DNS der generierten Plasmide pGFPC43, p43NGFP oder des Vektors pEGFP-N1 wurde in Rk13-Zellen transfiziert. Nach Fixierung der transfizierten Zellen, wurde die Lokalisation der Fluoreszenzsignale im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die Generierung einer Zelllinie (TCGFPC43), die das GFPC43 stabil exprimiert, wurde bereits (4.1.2) beschrieben. Fixierte TCGFPC43-Zellen wurden ebenfalls im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das unfusionierte GFP lag nach Expression des pEGFP-N1-Vektors über das gesamte Zytoplasma verteilt vor (Abb. 15 links). Unabhängig von der terminalen Lage des Fusionspartners konnten die exprimierten UL43-Fusionsproteine perinukleär in granulärer bis vesikulärer Form beobachtet werden (Abb. 15 Mitte). Das gleiche Fluoreszenzmuster zeigte das stabil exprimierte GFPC43 in TCGFPC43-Zellen (Abb. 15 rechts).

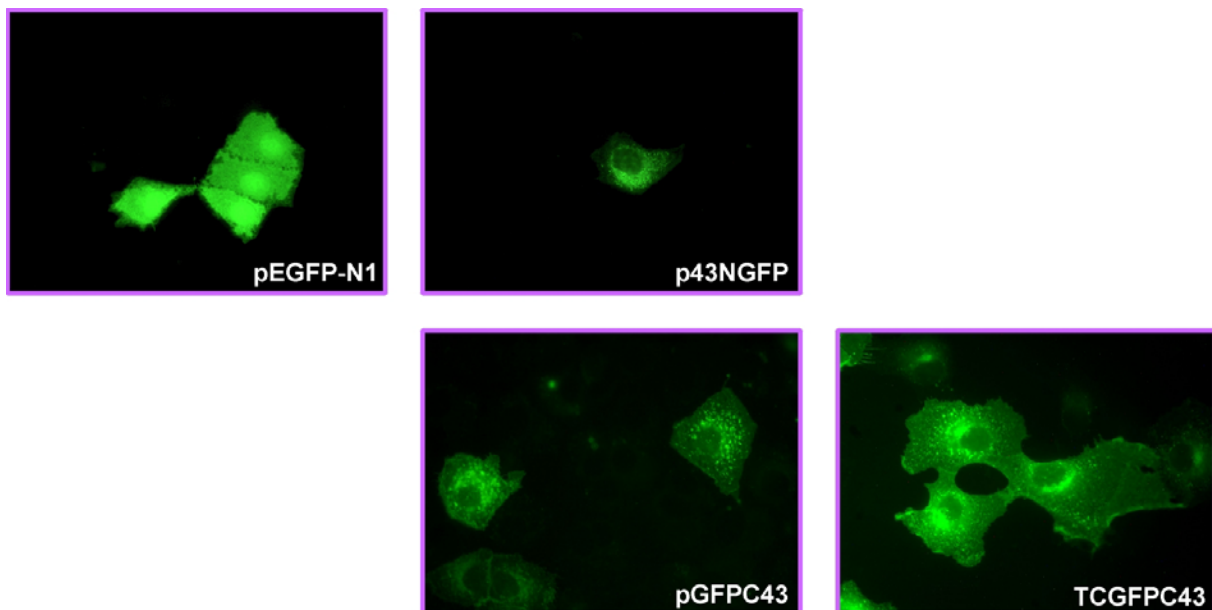


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopie - Darstellung der UL43-GFP-spezifischen Fluoreszenz nach Expression verschiedener Plasmide

Die Transfektion des reinen pEGFP-N1-Vektors zeigte die charakteristische intrazelluläre Verteilung des GFP. Nach Expression der UL43-Fusionsproteine durch Transfektion der Plasmide pGFPC43 und p43NGFP wurden ähnliche Muster in der Fluoreszenzverteilung beobachtet. Nach stabiler Expression des GFPC43 in den TCGFPC43-Zellen wurden keine markanten Unterschiede zur transienten Transfektion deutlich.

4.1.3.3.2 Der Einfluss der Zelldichte auf die Verteilung des GFPC43-Signals in TCGFPC43-Zellen

TCGFPC43-Zellen wurden zu bestimmten Zeitintervallen (10 h und 48 h) nach Aussaat fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. In wenig konfluenten Zellen, die kaum Zellkontakte ausbilden konnten, wurde das GFPC43 ausschließlich granulär bis vesikulär im Zytoplasma beobachtet (Abb. 16 links). Nach Etablierung eines dichten Zellverbandes kam es zu Veränderungen des Fluoreszenzmusters. Die GFPC43-Fluoreszenz erschien zusätzlich im Bereich der äußeren Zellmembranen (Abb. 16 rechts).

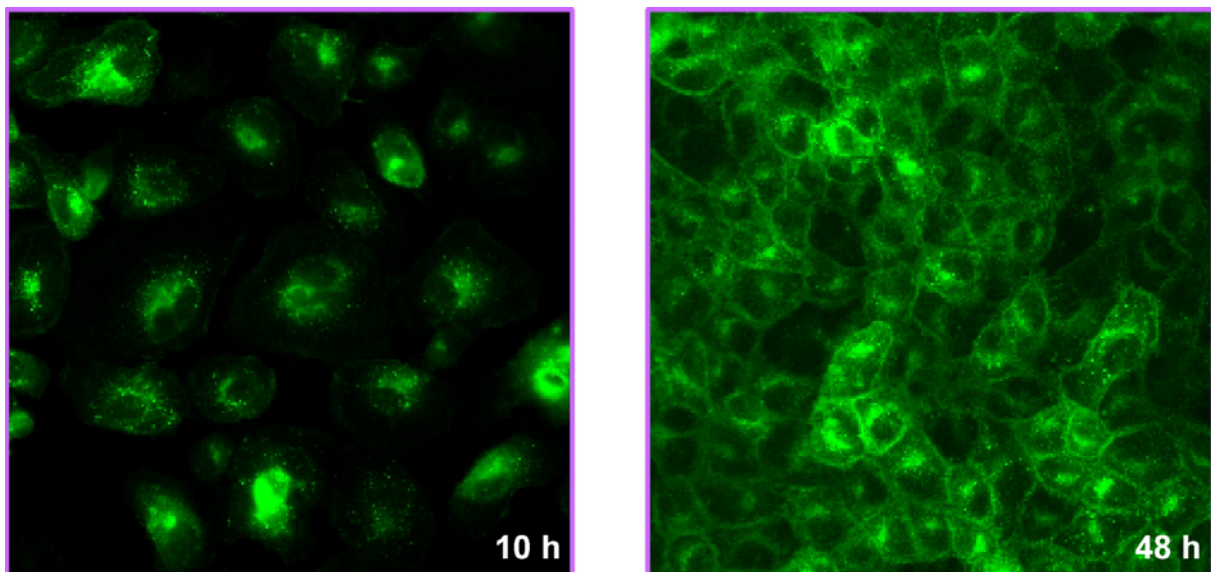


Abbildung 16: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie - GFPC43-Lokalisation

TCGFPC43-Zellen wurden 10 h oder 48 h nach Aussaat fixiert und im Konfokalen Laserscan-Mikroskop untersucht. Einzelzellen, die kaum Zellkontakte ausgebildet haben, trugen das GFPC43 granulär bis vesikulär verteilt im Zytoplasma. Nach 48 h war es im dichten Zellrasen auch an den Kontaktseiten zwischen den Zellen zu identifizieren.

4.1.3.3.3 Die Kolokalisation des GFPC43 mit γ -Adaptin und β -Catenin

Um die Lokalisation des GFPC43 genauer untersuchen zu können, wurden TCGFPC43-Zellen fixiert und auf verschiedene zelluläre Markerproteine gefärbt. Zur Detektion des Endoplasmatischen Retikulums wurde direkt Fluoreszenz-markiertes Concanavalin A (ConA) und zur Detektion des *trans*-Golgi Netzwerks ein Antikörper gegen das TGN-Protein γ -Adaptin eingesetzt. Die Fluoreszenzmuster des γ -Adaptins und des GFPC43 stimmten teilweise überein, wie anhand der Gelbfärbung der überlagernden Fluoreszenzsignale ersichtlich ist (Abb. 17 rechts). Die ConA-Verteilung entsprach dagegen nicht der GFPC43-Lokalisation (Abb. 17 links).

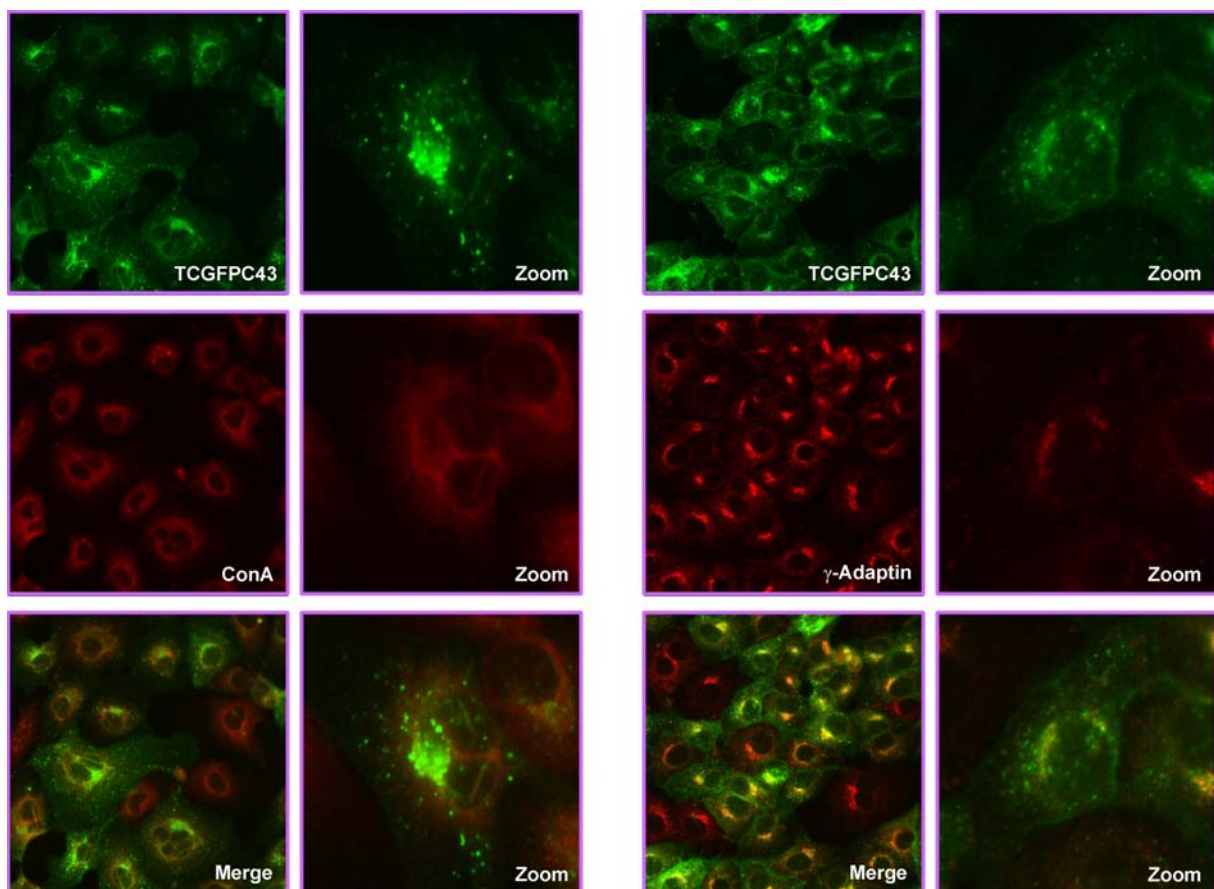


Abbildung 17: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie - Lokalisation von ConA und γ -Adaptin zu GFPC43 in TCGFPC43-Zellen

Die Lokalisation der spezifischen Fluoreszenzsignale des GFPC43 (grün) ist vergleichend mit denen des ConA (links, rot) und des γ -Adaptin (rechts, rot) dargestellt. Die jeweiligen Abbildungen wurden zur Verdeutlichung einer Kolokalisation übereinandergelegt (Merge).

Die GFPC43-Lokalisation entlang der Zellmembran im dichten Zellverband wurde mit Hilfe sogenannter Polarisationsmarker untersucht. Hierbei wurde die Detektion verschiedener Proteine in den Zellverbindungsstrukturen wie den TJ oder den Adherens Junctions (AJ) genutzt. Als TJ-Marker wurde das zonula occludens-1 (ZO-1)-Protein und als AJ-Marker das β -Catenin verwendet. Wie in den Abbildungen ersichtlich, war eine Kolokalisation zwischen GFPC43 und β -Catenin (Abb. 18 rechts) entlang der Zellmembran deutlich erkennbar, zwischen GFPC43 und ZO-1 dagegen nicht (Abb. 18 links).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GFPC43 in der TCGFPC43-Zelllinie sowohl mit dem TGN-Protein γ -Adaptin als auch mit der AJ-Komponente β -Catenin kolokalisiert vorliegt.

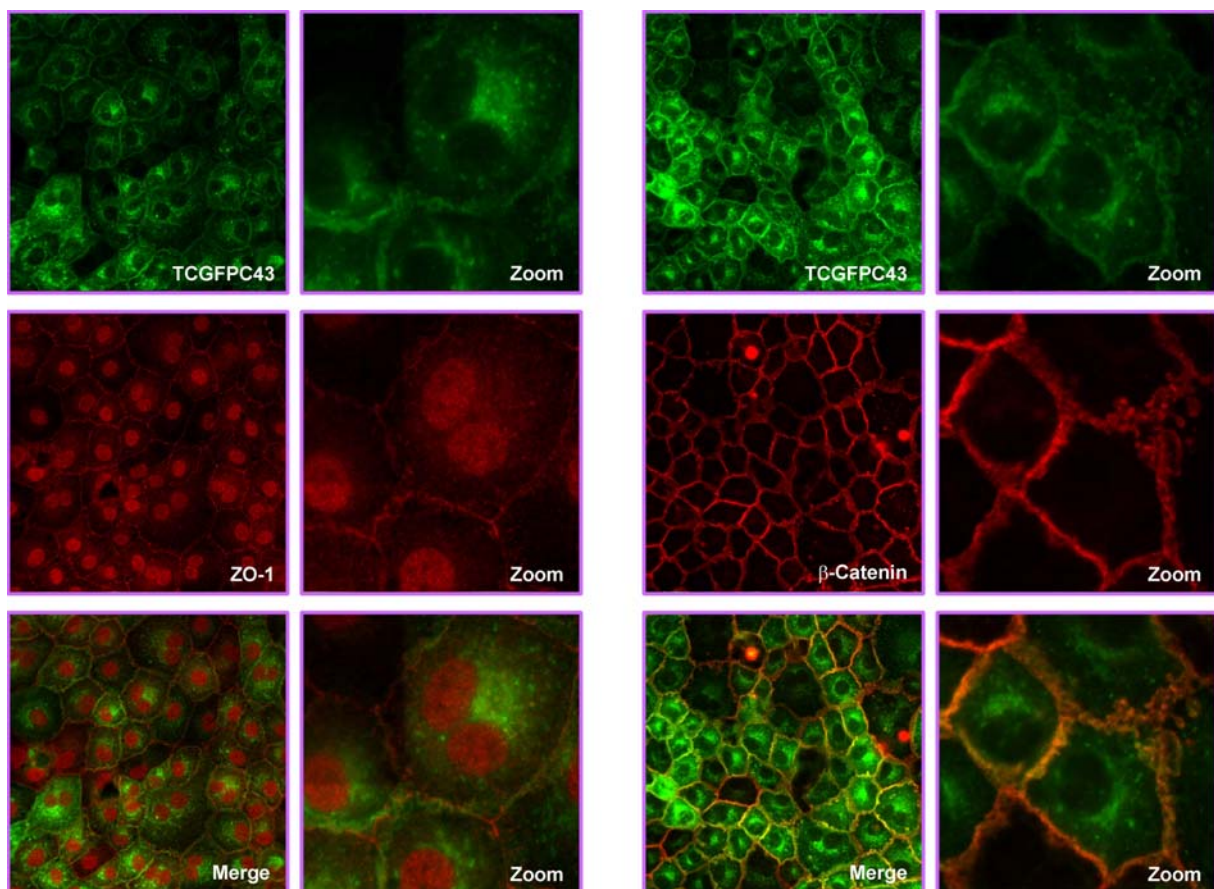


Abbildung 18: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie - Lokalisation von ZO-1 und β -Catenin zu GFPC43 in TCGFPC43-Zellen

Im Vergleich mit GFPC43 (grün) sind die Lokalisationen der spezifischen Fluoreszenzsignale von ZO-1 (links, rot) und β -Catenin (rechts, rot) abgebildet. Um eine Kolokalisation zu verdeutlichen, wurden die Einzeldarstellungen übereinandergelegt (Merge).

4.1.3.3.4 Die Lokalisation des GFPC43 in infizierten TCGFPC43-Zellen

Um den Einfluss der Infektion auf die Verteilung des GFPC43 zu beurteilen, wurden über einen und drei Tage gewachsene TCGFPC43-Zellen mit H Δ 43 (4.1.4) infiziert. Diese wurden 8 h p. i. fixiert und mit verschiedenen Antikörpern fluoreszenztechnisch gefärbt. Die bereits gezeigten Kolokalisationen zwischen GFPC43 und Bereichen des TGN bzw. den AJ blieben nach Infektion bestehen (Abb. 20). Dabei konnte kein Unterschied zur Verteilung in den nicht-infizierten Zellen (Abb. 17 und 18) beobachtet werden. Einzig eine leichte Verminderung in der Ausprägung von membranalem GFPC43 und β -Catenin schien durch die Infektion zu entstehen. Als Infektionsmarker wurde das EHV-1 Glykoprotein B genutzt. Dieses wurde mit dem monoklonalen Antikörper 4B6 detektiert (Abb. 19). Dieser Ansatz ließ eine weitere Kolokalisation zwischen GFPC43 und gB erkennen, die unabhängig von der Dichte des Zellrasens festgestellt wurde. Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass GFPC43 auch während der Infektion prinzipiell weiterhin mit γ -Adaptin (Abb. 20 links) und β -Catenin (Abb. 20 rechts) und zudem mit dem viralen Glykoprotein B (Abb. 19) kolokalisiert, wenn auch keine Quantifizierung der Verteilungsmuster vorgenommen werden konnte.

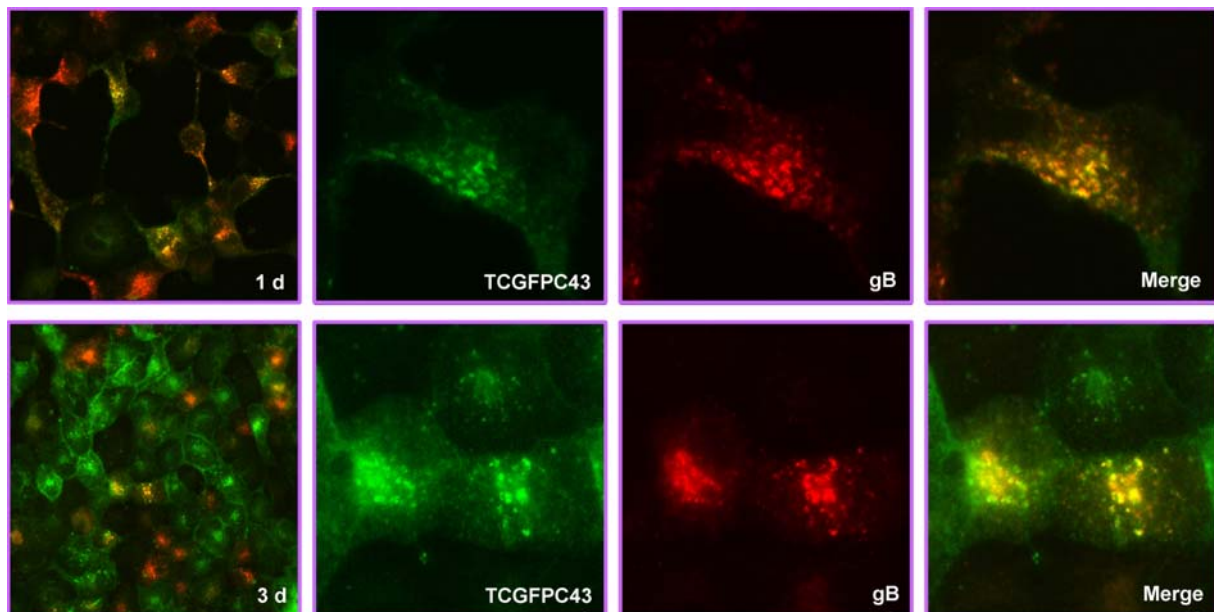


Abbildung 19: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie - Kolokalisation des GFPC43 mit gB (8 h p. i.)

Zur Darstellung infizierter Zellen wurde der Antikörper 4B6 gegen das virale gB (rot) verwendet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das GFPC43 (grün) in infizierten Zellen mit gB kolokalisiert (Merge). Unterschiede in der Dichte des TCGFPC43-Zellrasens nach Kultivierung über einen oder drei Tage waren offensichtlich nicht von Bedeutung.

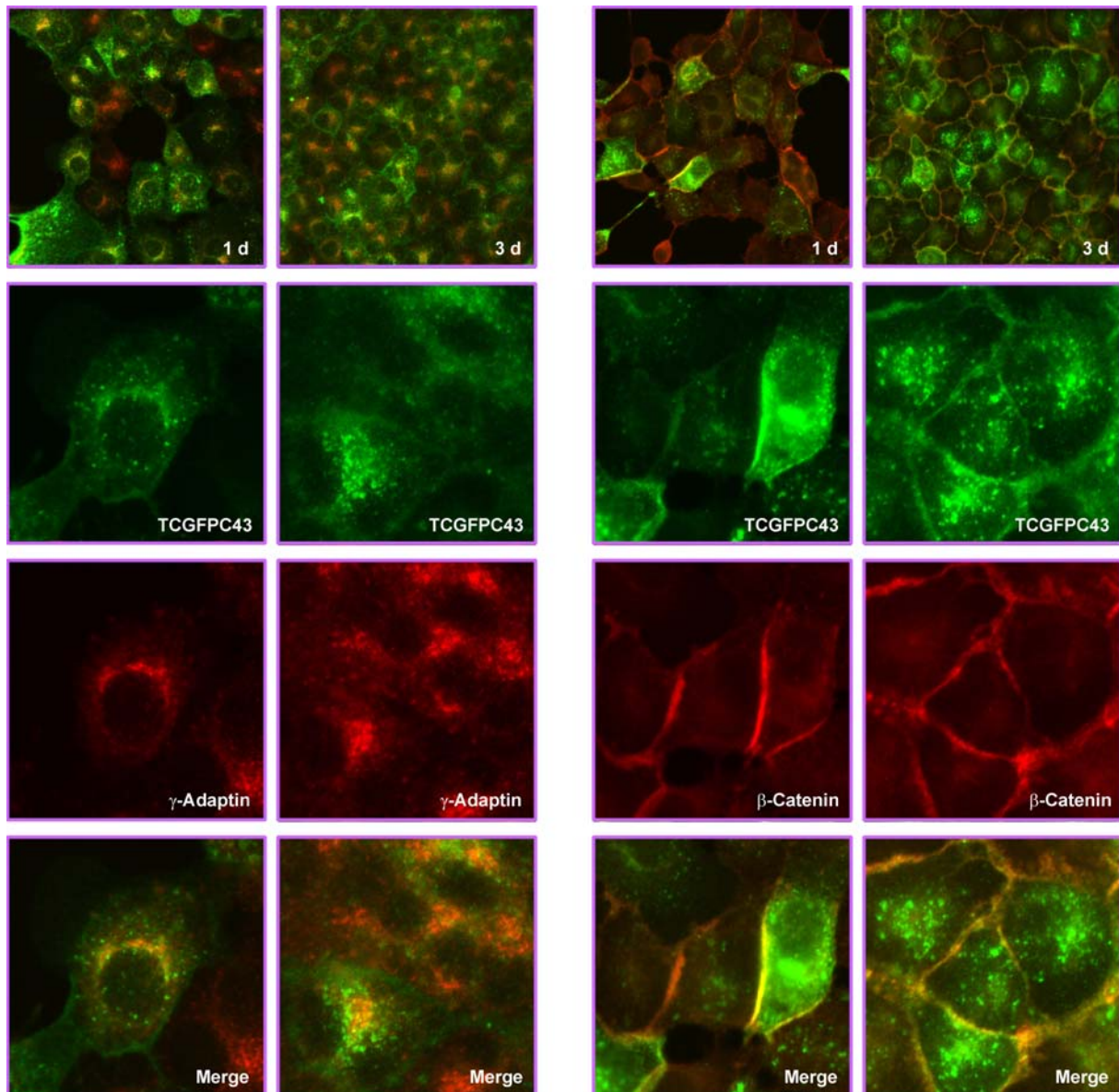


Abbildung 20: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie - Kolokalisation des GFPC43 mit γ -Adaptin und β -Catenin (8 h p. i.)

8 h p. i. konnten in den über einen bzw. drei Tage gewachsenen TCGFPC43-Zellen keine Unterschiede in der Kolokalisation (Merge) zwischen GFPC43 (links, grün) und γ -Adaptin (links, rot) als auch GFPC43 (rechts, grün) und β -Catenin (rechts, rot) beobachtet werden.

4.1.4 Die UL43-Deletionsmutante (H Δ 43)

4.1.4.1 Die Konstruktion eines UL43-negativen Virus basierend auf dem Stamm RacH

Zur funktionellen Charakterisierung des UL43-Proteins von EHV-1 wurde ein UL43-negatives Virus generiert. Mit Hilfe der BAC-Mutagenese wurde der gesamte UL43-Leserahmen aus dem Virusgenom des als BAC klonierten pRacH entfernt und schließlich durch eine nur 82 bp umfassende Narbensequenz ersetzt. Das nach Rekonstitution der Infektiosität in Rk13-Zellen und Restaurierung der Wildtyp-Sequenzen im Bereich der Insertion des mini F-Plasmids gewonnene UL43-deletierte Virus wurde als H Δ 43 bezeichnet. Abbildung 21 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der BAC-Mutagenese.

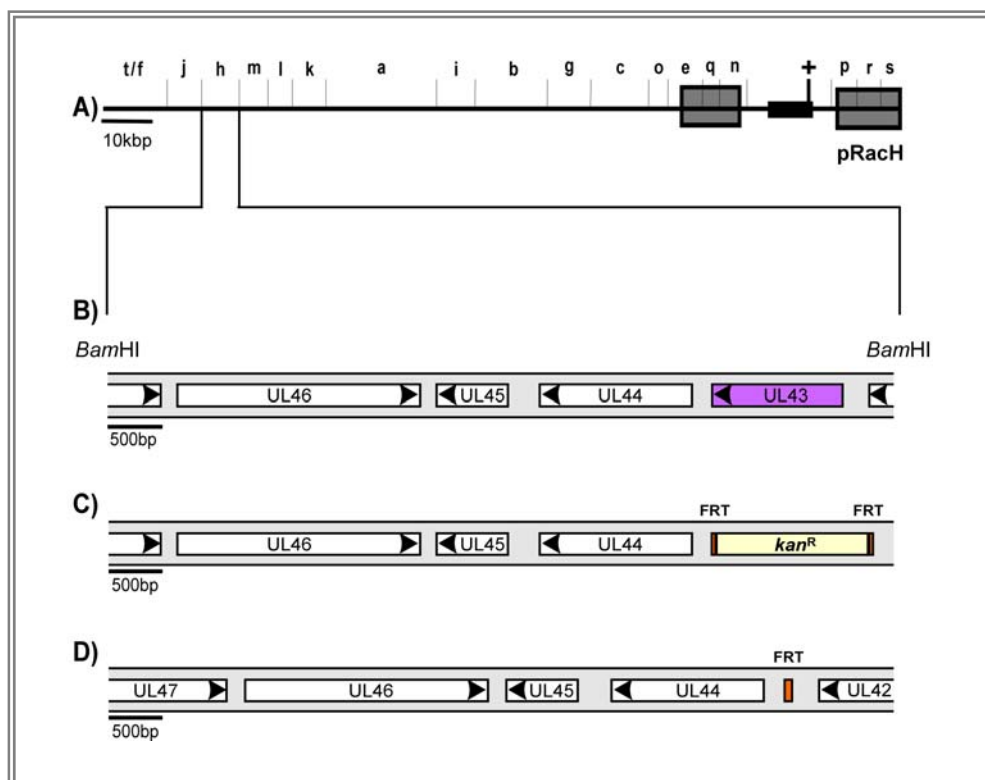


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Generierung des H Δ 43

Die Übersichtskarte zeigt (A) das *Bam*HI-Schnittmuster des pRacH-Genoms mit den *Bam*HI-Fragmenten a bis t. Mit einem „+“ ist die zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle in der eingefügten Sequenz des mini F-Plasmids pHA2 gekennzeichnet. Der UL43-Leserahmen liegt zwischen den ORF's UL44 und UL42 im *Bam*HI-„h“-Fragment (B) des Genoms. Nach Deletion des UL43-Leserahmens durch Insertion des *kan^R*-Gens (C) wurde in einem weiteren Schritt dieses Resistenzgen mit Hilfe der FLP recognition target sites (FRT) wieder eliminiert (D). Es verblieb eine Narbensequenz von 82 bp im mutagenisierten EHV-1-Genom.

4.1.4.2 Die Charakterisierung des Genotyps des HΔ43

Zur Überprüfung der UL43-Deletion wurde Virus-DNS sowohl von RacH als auch HΔ43 vergleichend im Agarosegel (Abb. 22 links) und im Southern Blot (Abb. 22 rechts) analysiert. Nach Restriktionsenzymverdau der präparierten Virus-DNS wurde der Ansatz in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Detektion der viralen Sequenzen des mutierten Bereiches wurde das 7.348 bp umfassende *Bam*HI-„h“-Fragment des EHV-1-Genoms markiert und zur DNS-DNS-Hybridisierung verwendet.

*Bam*HI

Der UL43-Leserahmen liegt innerhalb des *Bam*HI-„h“-Fragmentes, das 7.348 bp umfasst. Nach Deletion des UL43 blieb eine 82 bp umfassende Narbensequenz im mutierten Genom erhalten. Diese enthielt zusätzliche *Bam*HI- und *Pst*I-Erkennungssequenzen. Nach *Bam*HI-Verdau entstanden somit aus dem 7.348 bp-Fragment im UL43-negativen Genom zwei neue Fragmente von 5.680 bp und 545 bp.

*Eco*RI

Das 3.668 bp *Eco*RI-Fragment enthält den UL43-ORF. Nach dessen Deletion entstand bei *Eco*RI-Verdau ein verkürztes DNS-Stück mit einer Länge von 2.545 bp. Im Southern Blot wurde zusätzlich bei RacH und bei HΔ43 ein 9.518 bp-Fragment detektiert, das ebenfalls nach Hybridisierung mit dem *Bam*HI-„h“-Fragment markiert wurde.

*Pst*I

Die ursprüngliche UL43-Region enthält eine *Pst*I-Schnittstelle, die durch die oben erwähnte neue Schnittstelle in der Narbensequenz ersetzt wurde. Es veränderten sich daher nach Deletion der UL43-Sequenz beide *Pst*I-Fragmente mit einer Länge von 5.028 bp und 3.160 bp. Beide waren nach *Pst*I-Verdau der UL43-negativen Virus-DNS kleiner (4.700 bp und 2.365 bp). Im Southern Blot war die Abnahme von 5.028 bp auf 4.700 bp sowie die zusätzliche Bande bei 2.365 bp deutlich erkennbar. Da das mutagenisierte Fragment im Bereich von 3.160 bp im Originalzustand doppelmolar vorliegt, blieb diese jetzt einfach molare Bande beim Verdau der UL43-deletierten DNS erhalten.

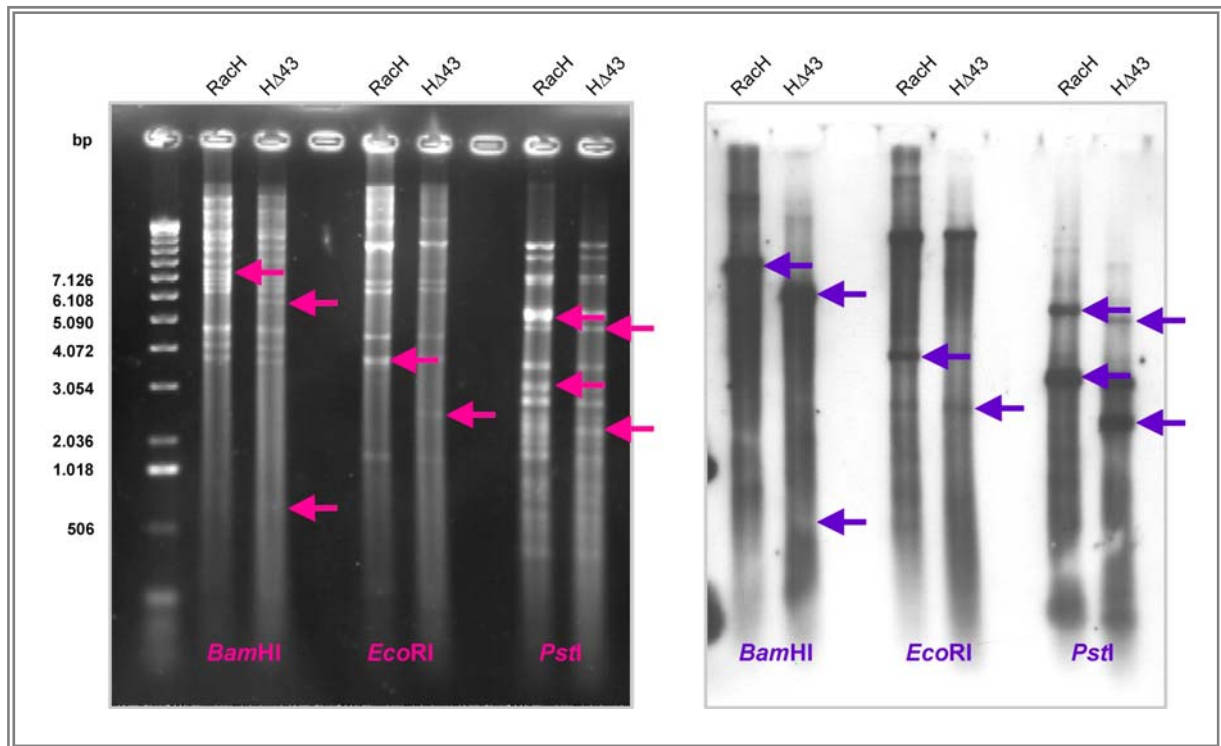


Abbildung 22: Agarosegel und Southern Blot - Darstellung des HΔ43-Genotyps

Die virale DNS des Elternstammes RacH und der Deletionsmutante HΔ43 wurde durch die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI und *Pst*I verdaut und im Agarosegel (links) und im Southern Blot (rechts) auf die resultierenden Unterschiede im Schnittmuster untersucht. Mit Pfeilen sind jeweils die erwarteten bzw. veränderten Fragmente gekennzeichnet. Die Größen eines DNS-Standards sind am linken Bildrand in bp angezeigt.

4.1.4.3 Die Darstellung des HΔ43 im Western Blot

Mit der UL43-Deletionsmutante infizierte Zellen wurden im Western Blot untersucht, um festzustellen, ob die Deletion Auswirkungen auf die Expression anderer viraler Proteine hatte. Dazu wurden Rk13-Zellen sowohl mit dem Wildtyp-Virus RacH als auch mit HΔ43 infiziert (2 PbE pro Zelle) und nach 16 h Zelllysate gewonnen. Mit Hilfe der Antikörper gegen gB (3F6), gD, pUL11, pUL20, pUL34 und pUL45 konnte die Expression der entsprechenden viralen Proteine verglichen werden. Es waren keine markanten Abweichungen in der Expression dieser Proteine festzustellen, die einen Querschnitt von „early“ bis „true-late“ exprimierten Proteinen repräsentierten (Abb. 23).

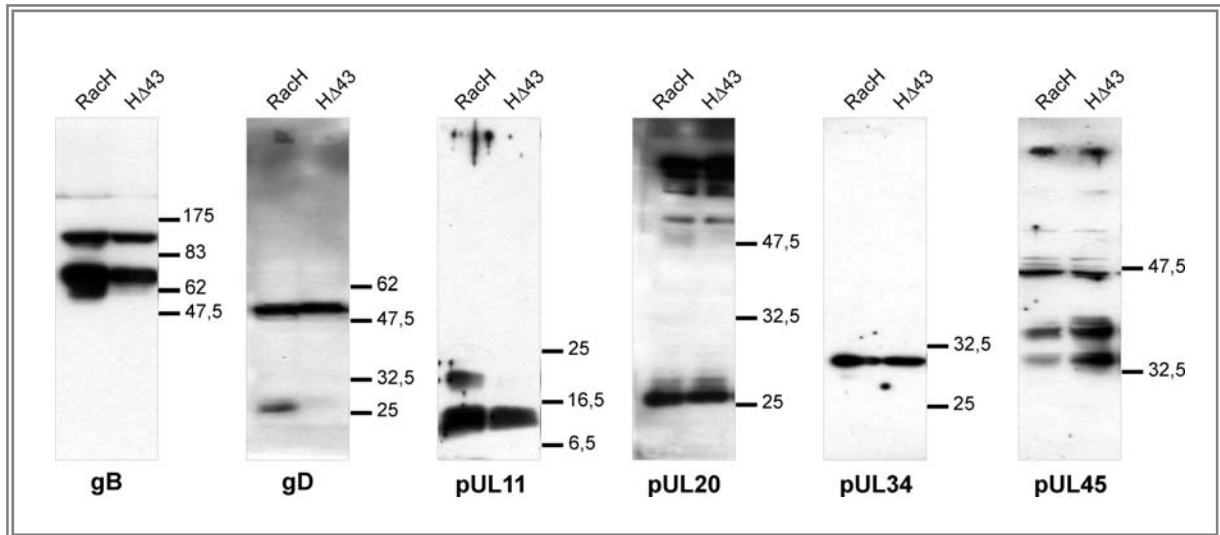


Abbildung 23: Western Blot - Expression verschiedener viraler Proteine nach Infektion mit RacH oder HΔ43

Die dargestellten Western Blots enthielten jeweils Lysate von mit RacH oder HΔ43 infizierten Rk13-Zellen. Durch die verwendeten Antikörper konnten verschiedene virale Proteine detektiert werden. Die entsprechenden Proteine sind jeweils angegeben. Die Größen eines Proteinstandards sind jeweils am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

4.1.4.4 Die funktionelle Charakterisierung des HΔ43 in Zellkultur

4.1.4.4.1 Der Plaquephänotyp des HΔ43

Um Auswirkungen der UL43-Deletion auf die Plaquegröße untersuchen zu können, wurden über einen oder drei Tage gewachsene Rk13- und TCGFPC43-Zellen mit RacH oder HΔ43 (100 PbE pro Loch einer 6-Loch-Platte) infiziert. Die infizierten Zellen wurden mit Methylzellulose überschichtet und die gebildeten Plaques nach drei Tagen vermessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in den beiden Diagrammen (Abb. 24 und 25) zusammenfassend dargestellt. Sowohl auf ein als auch auf drei Tage gewachsenen Rk13-Zellen konnte für HΔ43 im Vergleich zu RacH eine Verringerung in den mittleren Plaqueflächen von 25 % beobachtet werden (Abb. 24). Diese Differenz war auf den TCGFPC43-Zellen weniger deutlich ausgeprägt. Bei über einen Tag gewachsenen TCGFPC43-Zellen betrug der Unterschied in der Plaquefläche zwischen RacH und HΔ43 noch 16 %. Auf den dichterem über drei Tage gewachsenen TCGFPC43-Zellen dagegen nur noch 6 % (Abb. 25).

Zusätzlich wurden die verglichenen Plaques mit einem Antikörper (2A2), der das virale Protein gC detektiert, gefärbt, um diese für das Fluoreszenzmikroskop dokumentierbar zu machen und um gleichzeitig sicherzustellen, dass das benachbarte gC (UL44) auch nach UL43-Deletion normal exprimiert wird. Stellvertretende Plaquebilder sind in den Abbildungen 24 und 25 vergleichend dargestellt.

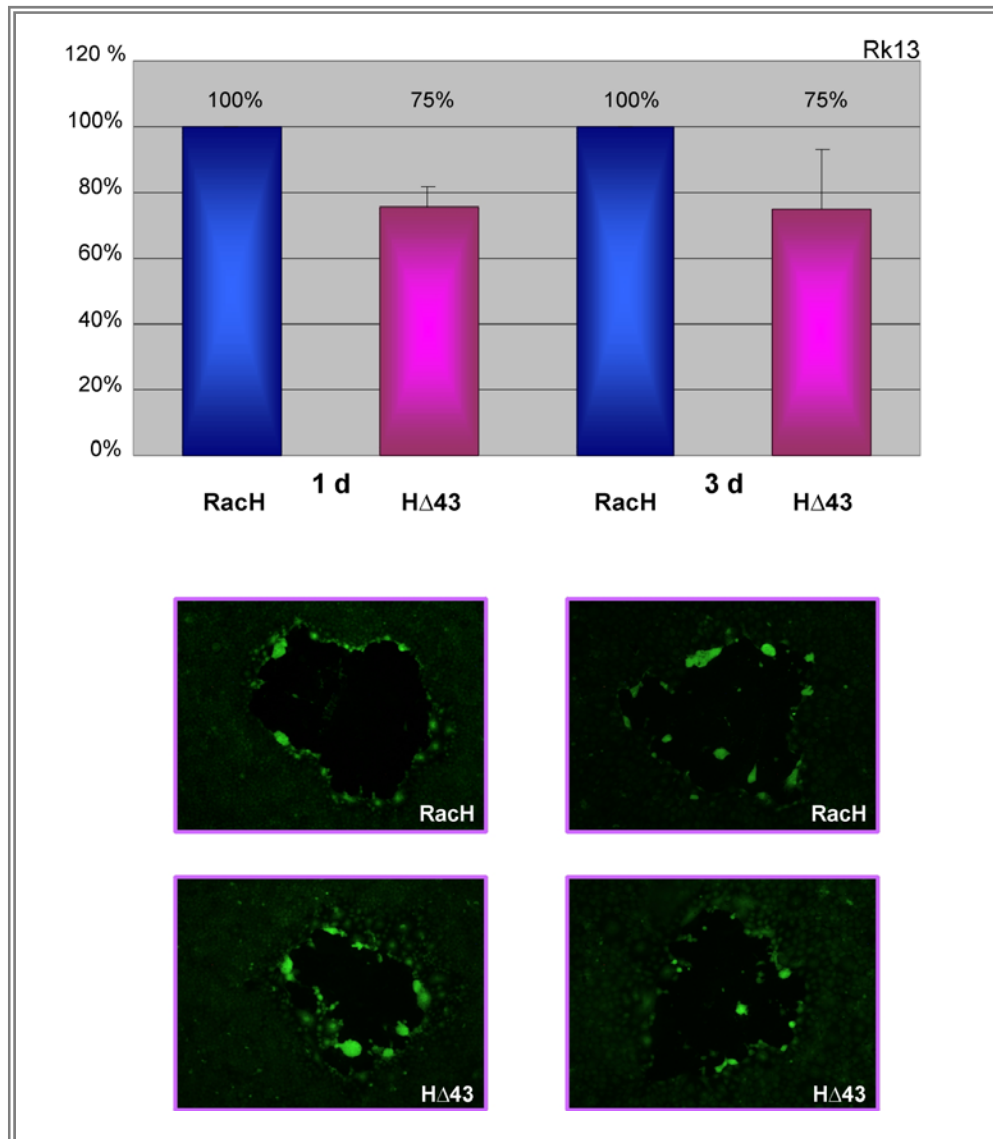


Abbildung 24: Plauegrößenvergleich zwischen RacH und HΔ43 auf Rk13-Zellen

Das Balkendiagramm zeigt die gemessenen Unterschiede zwischen den gebildeten RacH- und HΔ43-Plaques auf über einen oder drei Tage kultivierten Rk13-Zellen. Die mittleren Plaqueflächen von RacH wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der HΔ43-Flächen relativ zu RacH dargestellt. Zur Datenermittlung wurden vier unabhängige Versuche ausgewertet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Balken aufgetragen. Repräsentative im Fluoreszenzmikroskop dokumentierte Plaques sind vergleichend dargestellt.

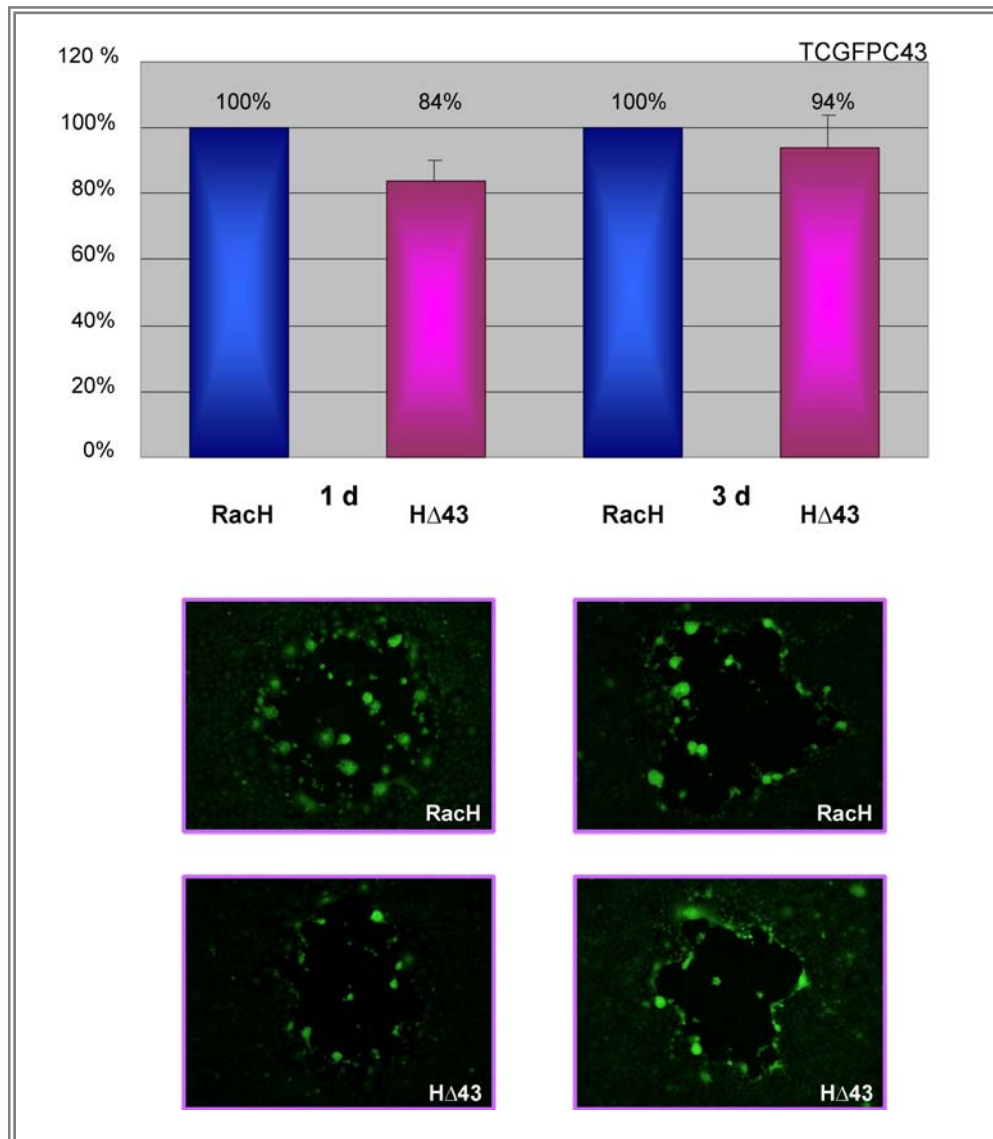


Abbildung 25: Plauegrößenvergleich zwischen RacH und HΔ43 auf TCGFPC43-Zellen

Die Plauequerschnitts von RacH und HΔ43 wurden ebenfalls auf über einen oder drei Tage gewachsenen TCGFPC43-Zellen verglichen. Die mittleren Flächen der HΔ43-Plaques wurden in Relation zu denen der RacH-Plaques gesetzt, die mit 100 % dargestellt werden. Zur Datenermittlung wurden vier unabhängige Versuche ausgewertet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Balken aufgetragen. In der IIF gefärbte Plaques wurden fotografiert und sind vergleichend dargestellt.

4.1.4.4.2 Die Penetrationsfähigkeit des HΔ43

Auswirkungen der UL43-Deletion auf die Penetrationseigenschaften des EHV-1 wurden mittels Penetrationsassay untersucht. Dabei wurden konfluente Rk13-Zellen mit einer PbE von 100 pro Loch einer 6-Loch-Platte entweder mit RacH oder mit HΔ43 infiziert und nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll alle noch nicht penetrierten Viren zu bestimmten Zeitpunkten mit Zitratpuffer inaktiviert. Die zu den verschiedenen Zeitwerten nach Beginn der Penetration (0, 10, 20, 40, 60 und 80 min) gebildeten Plaques wurden nach drei Tagen gezählt und in Relation zur Kontrolle ohne Zitratbehandlung ausgewertet. In Abbildung 26 ist die Effizienz der Penetration von RacH und HΔ43 in Prozent dargestellt. Die Penetrationsgeschwindigkeit beider Viren war nahezu identisch.

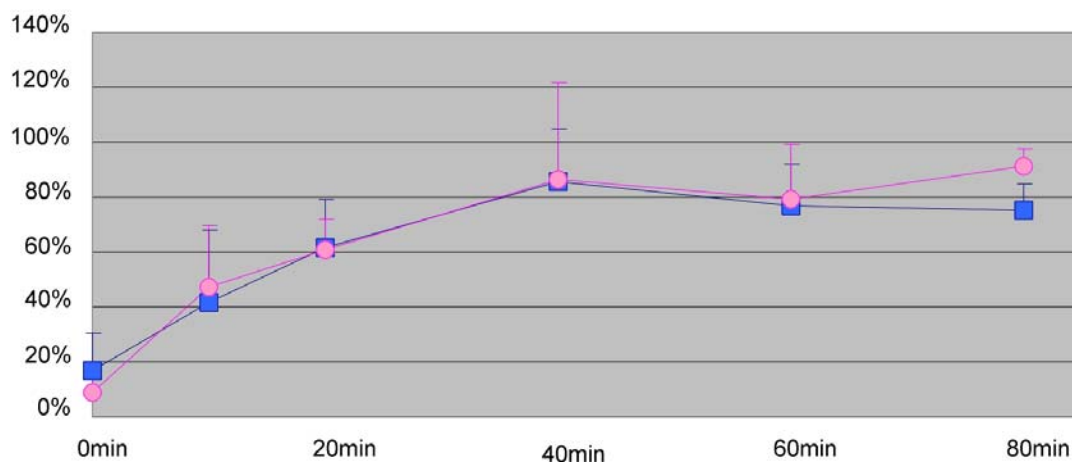


Abbildung 26: Vergleich der Penetrationsfähigkeit zwischen RacH und HΔ43

Die Untersuchung der Penetrationseffizienz von RacH (— ■ —) und HΔ43 (— ● —) ergab keine Differenzen im Verlauf der beiden ermittelten Penetrationskurven. Zur Datenermittlung wurden vier unabhängige Versuche ausgewertet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Symbolen aufgetragen.

4.1.4.4.3 Die Einschnitt-Wachstumskinetik des HΔ43

Die Wachstumseigenschaften von HΔ43 wurden vergleichend mit denen von RacH untersucht. Dazu wurden wie beschrieben konfluente Rk13-Zellen mit RacH oder HΔ43 infiziert (fünf PbE pro Zelle) und nach Protokoll behandelt. Nach bestimmten Zeitpunkten (0, 4, 8, 12, 24 und 30 h) wurde jeweils der Überstand und die Zellen separat gewonnen, um durch Virustitration die intra- und extrazellulären Titer ermitteln zu können. Die erhaltenen Titer wurden ausgewertet und Wachstumskurven erstellt.

Abbildung 27 zeigt die resultierenden Wachstumskurven für die intra- und die extrazelluläre Infektiosität der beiden Viren. Intrazellulär zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Wachstumskurven mit im Vergleich zu RacH 1,3fach bis 6,6fach erniedrigten Titern von H Δ 43. Beim Vergleich der extrazellulären Infektiosität fiel auf, dass die H Δ 43-Werte ebenfalls nur gering zwischen 1,4fach und 9,3fach reduziert waren.

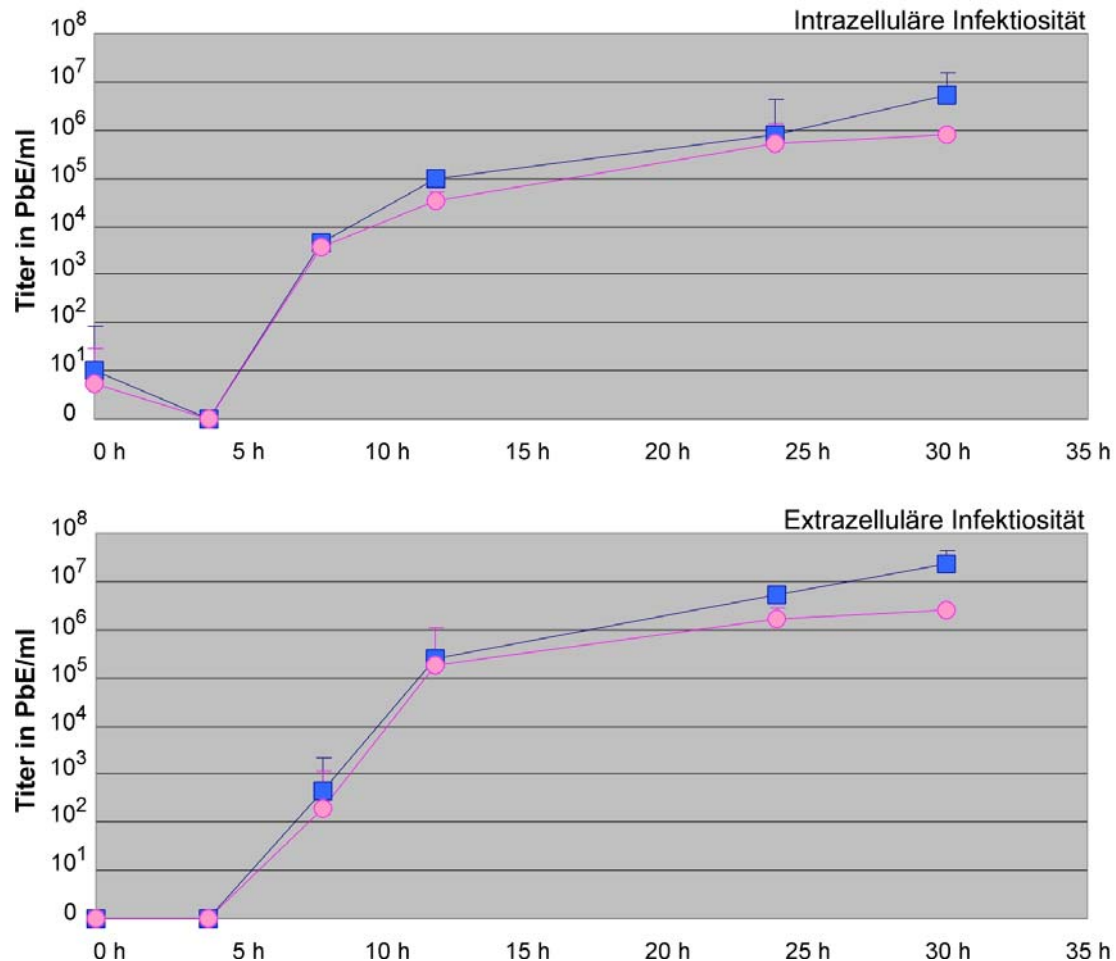


Abbildung 27: Wachstumskurven der intra- und extrazellulären Infektiositäten von RacH und H Δ 43

Dargestellt sind die aus zwei Experimenten ermittelten Wachstumskurven für RacH (— ■ —) und H Δ 43 (— ● —) auf Rk13-Zellen. Die erhaltenen Werte der intrazellulären Infektiositäten waren für die Deletionsmutante H Δ 43 im Gegensatz zum Wildtyp-Virus RacH um 1,3fach bis 6,6fach und die der extrazellulären Infektiositäten um 1,4fach bis 9,3fach vermindert. Standardabweichungen sind über den jeweiligen Symbolen aufgetragen.

4.2 Die polarisierten Zellen

4.2.1 Die vergleichende Darstellung von Rk13- und MDCK-Zellen in der IIF

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, die EHV-1-Infektion im polarisierten Zellverband zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Ansatz die normalerweise für Untersuchungen mit EHV-1 herangezogenen Rk13-Zellen auf ihre Polarisierbarkeit hin analysiert. Dazu wurden diese vergleichend mit der definiert polarisierbaren Zelllinie MDCK in der IIF mit Polarisationsmarkern untersucht. Polarisationsmarker sind Proteine, die Teil der Zellverbindungsstrukturen des polarisierten Zellverbandes sind.

Die hier verwendeten Polarisationsmarker waren das ZO-1, das ein wichtiger Bestandteil der TJ ist, und das β -Catenin, das in den AJ zu finden ist (2.4.2). Diese Proteine wurden mit Hilfe entsprechender Antikörper nachgewiesen. Es wurden MDCK- und Rk13-Zellen dünn ausgesät, nach verschiedenen Zeitintervallen (10, 24 und 72 h) fixiert und auf ZO-1 (Abb. 28 links) und β -Catenin (Abb. 28 rechts) untersucht. In beiden Zelllinien konnte sowohl die Ausbildung von TJ als auch von AJ unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden.

Die Präsenz dieser Zell-Verbindungen in Rk13-Zellen erlaubte die Annahme, auch diese Zelllinie könnte zumindest zu einem bestimmten Grad polarisierbar sein. Daher wurde in den folgenden Experimenten für die unter polarisierenden Bedingungen kultivierten Rk13-Zellen ein gewisser Grad an Polarisierung vorausgesetzt und diese als polarisierte Rk13-Zellen bezeichnet.

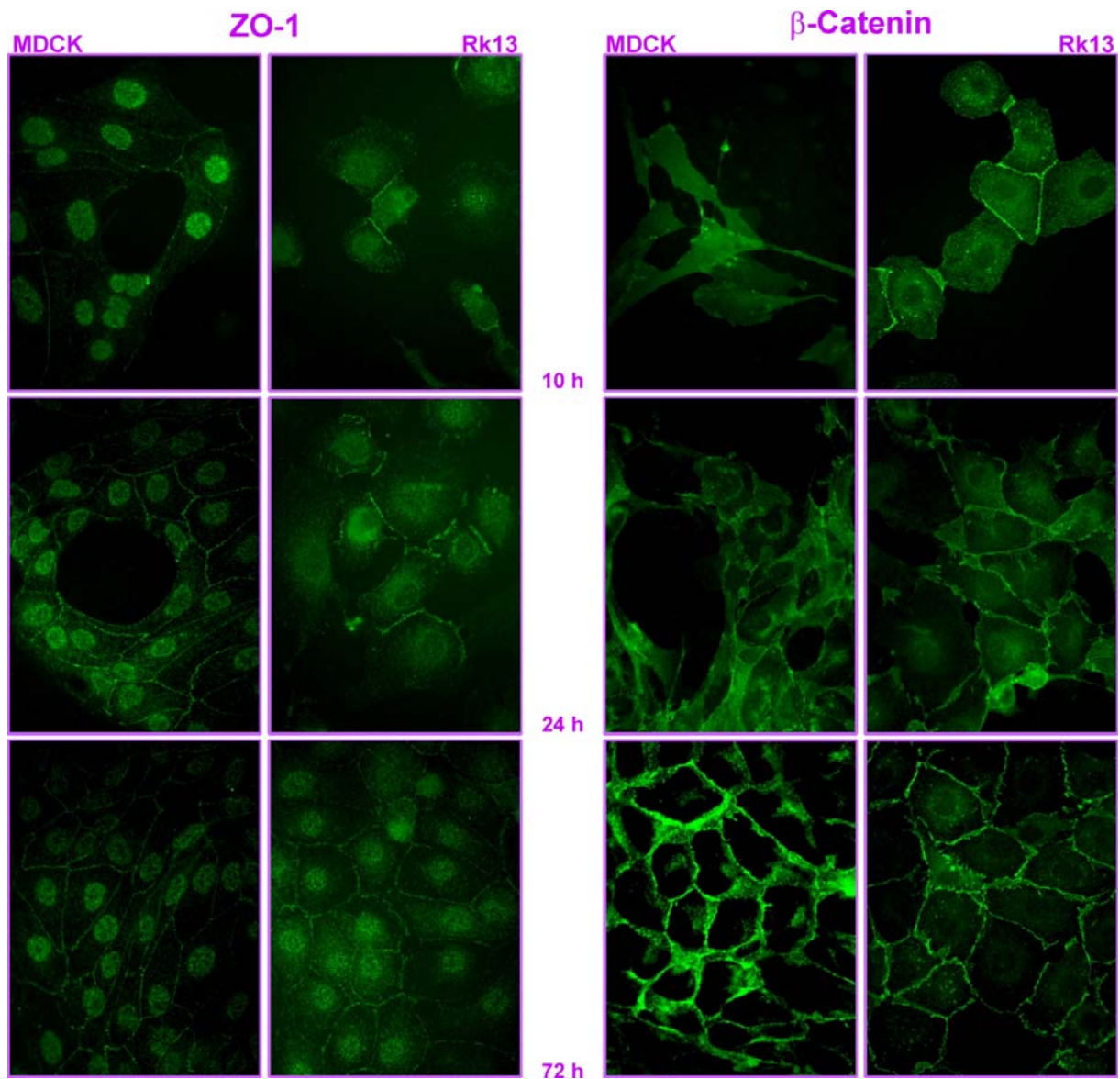


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie - Darstellung von Zellverbindungsstrukturen in MDCK- und Rk13-Zellen

Verschieden dichte MDCK- und Rk13-Zellen wurden mit Hilfe von Antikörpern auf die Polarisationsmarker ZO-1 (links) und β -Catenin (rechts) untersucht und unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Die für einen polarisierten Zellrasen charakteristischen Kontaktstrukturen (TJ und AJ) zwischen den Zellen konnten auf diese Weise indirekt in beiden Zelllinien detektiert werden.

4.2.2 Die Infektion polarisierter Zellen

4.2.2.1 Der Vergleich der Infizierbarkeit von Rk13- und MDCK-Zellen mittels Fluoreszenz

Zur weiteren Untersuchung der EHV-1-Infektion auf polarisierten Zellen wurden vergleichend polarisierte Rk13- und definiert polarisierte MDCK-Zellen infiziert. Über die Rk13-Zelllinie ist bekannt, dass sie in Zellkultur gut mit EHV-1 zu infizieren ist. Dieser Aspekt sollte hier auch für MDCK-Zellen untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden über drei Tage kultivierte, polarisierte Rk13- und MDCK-Zellen mit H Δ gp2 (zwei PbE pro Zelle), einem GFP-exprimierenden, rekombinanten Virus (RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002), infiziert. Nach 6 h und 24 h wurden die Zellen fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bei den Rk13-Zellen konnte das bekannte Bild eines durchweg infizierten Zellrasens bereits 6 h p. i. beobachtet werden. Die MDCK-Zellen waren dagegen selbst 24 h p. i. weitestgehend uninfiziert (Daten nicht gezeigt).

Da durch die Zellverbindungsstrukturen eines polarisierten Zellverbandes nur die apikale Plasmamembrandomäne für das Virus zugänglich ist, wurden im anschließenden Versuchsaufbau die Zellverbände artifiziell unterbrochen. Dabei wurde in den Zellrasen über drei Tage gewachsener polarisierter Rk13- und MDCK-Zellen eine „Strasse“ gekratzt, um den Viren auch die basolateralen Membrandomänen der Zellen zugänglich zu machen. Die Zellen wurden abermals mit H Δ gp2 (zwei PbE pro Zelle) infiziert und jeweils 6 h und 48 h p. i. fixiert. Die Ergebnisse konnten im Fluoreszenzmikroskop bewertet und dokumentiert werden. Die Infektion der Rk13-Zellen zeigte bereits 6 h p. i. eine Ausbreitung infizierter Zellen über den gesamten Zellrasen, der sich 48 h p. i. deutlich auflöste (Abb. 29 links). Bei den MDCK-Zellen waren dagegen 6 h p. i. nur randständig entlang der „Strasse“ infizierte Zellen zu beobachten. Die Infektion breitete sich anschließend jedoch auch über den angrenzenden Zellverband aus, so dass 48 h p. i. der Zellrasen ebenfalls durchgehend infiziert war (Abb. 29 rechts).

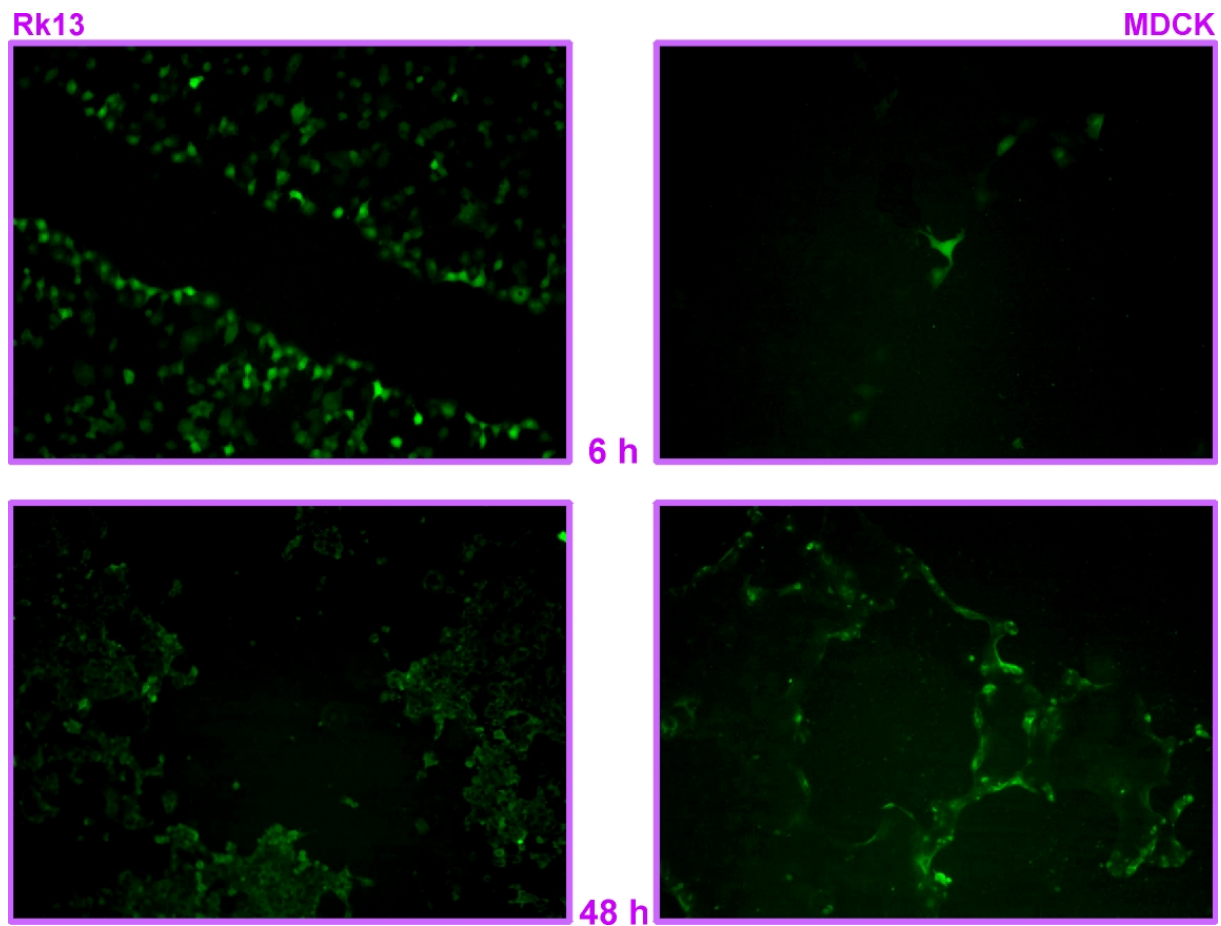


Abbildung 29: Vergleichende Darstellung infizierter Rk13- und MDCK-Zellen nach artifizierter Unterbrechung des Zellrasens

Über drei Tage kultivierte, polarisierte Rk13- und MDCK-Zellen wurden nach artifizierter Unterbrechung des Zellrasens für 6 h und 48 h mit H Δ gp2 (zwei PbE pro Zelle) infiziert, fixiert und zur Dokumentation fotografiert. Vergleichend sind hier die Auswirkungen der Infektion auf den Zellverband für Rk13- (links) und MDCK-Zellen (rechts) dargestellt.

4.2.2.2 Das EHV-1-Wachstum auf polarisierten Zellen im Transwell®-Filtersystem

Um das Wachstum von EHV-1 auf *in vitro* polarisierten Zellen untersuchen zu können, wurden über drei Tage kultivierte Rk13- und MDCK-Zellen sowohl von apikal als auch von basolateral infiziert. Dazu wurden die Zellen auf Polyester- (Rk13-Zellen) bzw. Polycarbonat-Membranen (MDCK-Zellen) mit 0,4 µm Porengröße im Transwell®-Filtersystem kultiviert. Es wurde täglich der Mediumstand im inneren und äußeren Kompartiment kontrolliert und der ansteigende transepitheliale Widerstand (TER) gemessen und dokumentiert. Die Infektion mit RacL11 (zwei PbE pro Zelle) erfolgte entweder von apikal oder von basolateral. Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 4, 8, 12, 24 und 30 h p. i.) wurden dann der Überstand, der Unterstand und die Zellen separat gewonnen. Die jeweiligen Infektiositäten wurden durch Virustitration ermittelt und ausgewertet. Die Verlaufskurven der aus Über-, Unterstand und Zellen bei apikaler oder bei basolateraler Infektion erhaltenen Titer sind in den Abbildungen 30 und 31 dargestellt. Sowohl bei der apikalen als auch bei der basolateralen Infektion der Rk13-Zellen war ab 8 h p. i. bzw. 12 h p. i. ein Titeranstieg in Über-, Unterstand und Zellen (Abb. 30 und 31) zu detektieren. In den parallel geführten Untersuchungen mit MDCK-Zellen war nach apikaler oder nach basolateraler Virusapplikation nach einem mäßigen Anstieg bis 12 h p. i. eher eine Stagnation im Titerverlauf zu beobachten (Abb. 30 und 31).

Die Summe der aus Über-, Unterstand und Zellen bei apikaler oder bei basolateraler Infektion von Rk13- und MDCK-Zellen erhaltenen Titer sind in Abbildung 32 dargestellt. Nach Infektion der Rk13-Zellen wurden bei basolateraler Applikation bis 8 h p. i. 8,1fach bis 26,3fach höhere Titersummen erzielt als bei apikaler Applikation. Ab 12 h p. i. erschien die Replikation nach apikaler Infektion als 7,4fach bis 56,2fach effizienter. Nach Infektion der MDCK-Zellen waren dagegen während der gesamten 30 h um 3,5fach bis 35fach höhere Titersummen nach basolateraler Applikation zu beobachten.

Zusätzlich sind die TER als Verlaufskurven parallel zu den gewonnenen Infektiositätswerten dargestellt (Abb. 33). Zu Beginn der Infektion blieb der TER der Rk13-Zellen konstant und fiel zwischen 12 h p. i. und 24 h p. i. leicht ab. Bei den MDCK-Zellen konnte dagegen anfangs ein Abfall im TER bis 12 h p. i. beobachtet werden, der sich ab 12 h p. i. umkehrte und bis 30 h p. i. wieder deutlich anstieg. Für die weiterführenden Untersuchungen in diesem System wurde daher der Zeitpunkt von 12 h p. i. gewählt, da im Falle der Rk13-Zellen mit Abfall der Widerstände eine Durchmischung zwischen innerem und äußerem Kompartiment erwartet werden konnte.

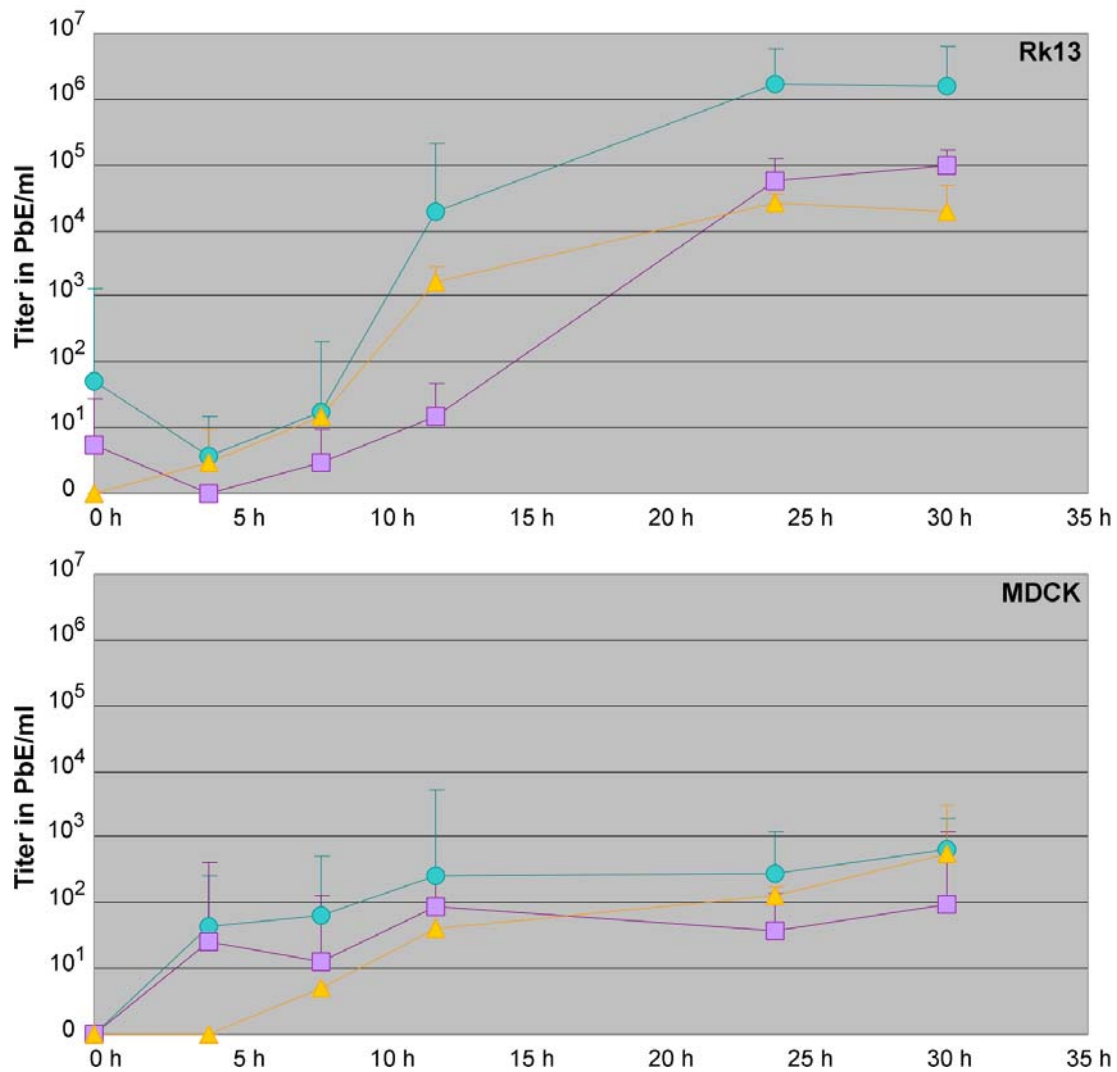


Abbildung 30: Apikale Infektion polarisierter Rk13- und MDCK-Zellen mit RacL11

Darstellung der aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelten Kurven der Virustiter von Über- (—●—), Unterstand (—■—) und Zellen (—▲—) nach apikaler RacL11-Infektion polarisierter Rk13- und MDCK-Zellen. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Symbolen aufgetragen.

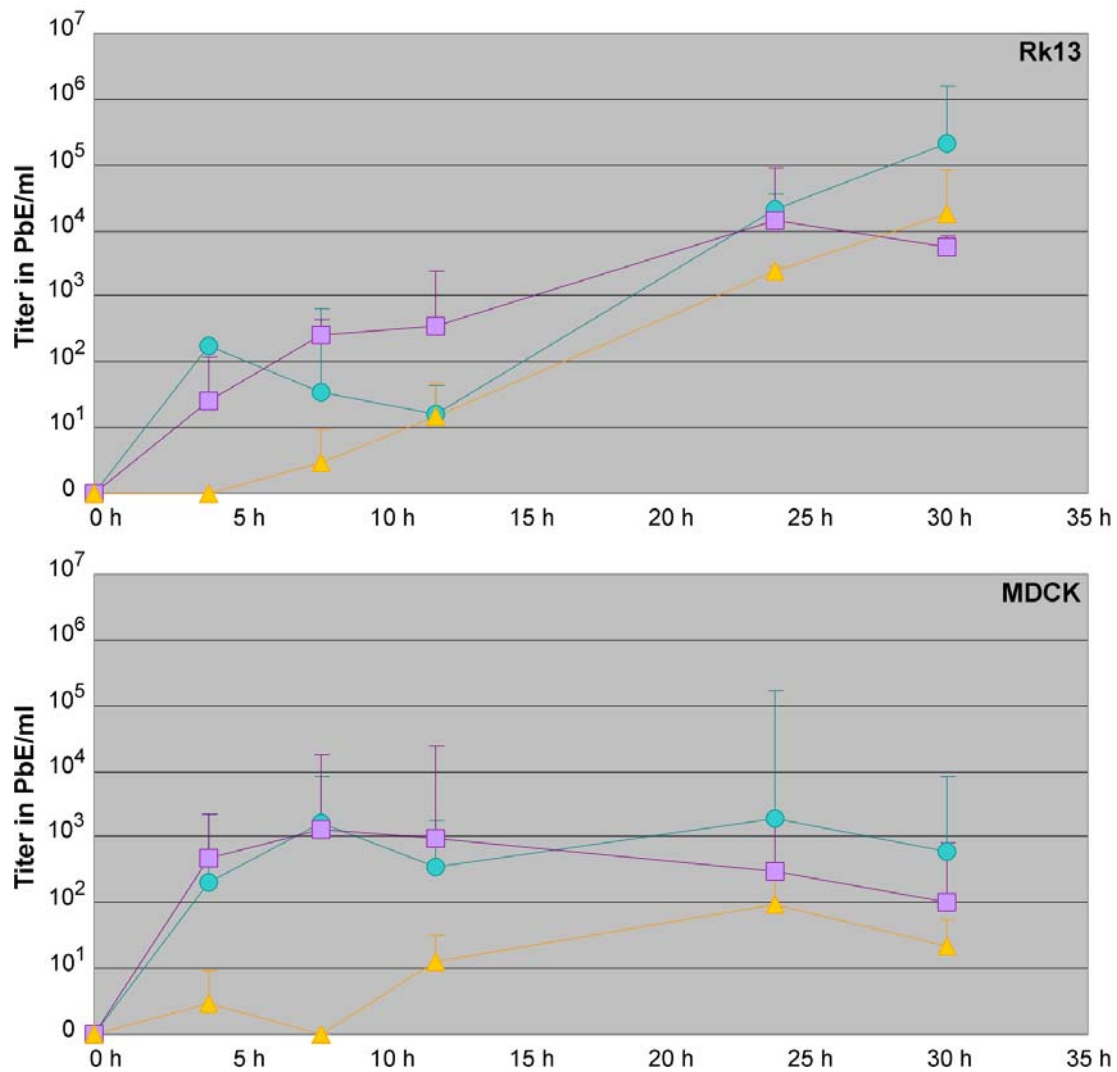


Abbildung 31: Basolaterale Infektion polarisierter Rk13- und MDCK-Zellen mit RacL11.

Nach basolateraler Infektion wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Über- (—●—), Unterstände (—■—) und Zellen (—▲—) gesammelt und deren Titer bestimmt. Die ermittelten Werte zweier unabhängiger Versuche wurden in den abgebildeten Verlaufskurven wiedergegeben. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Symbolen aufgetragen.

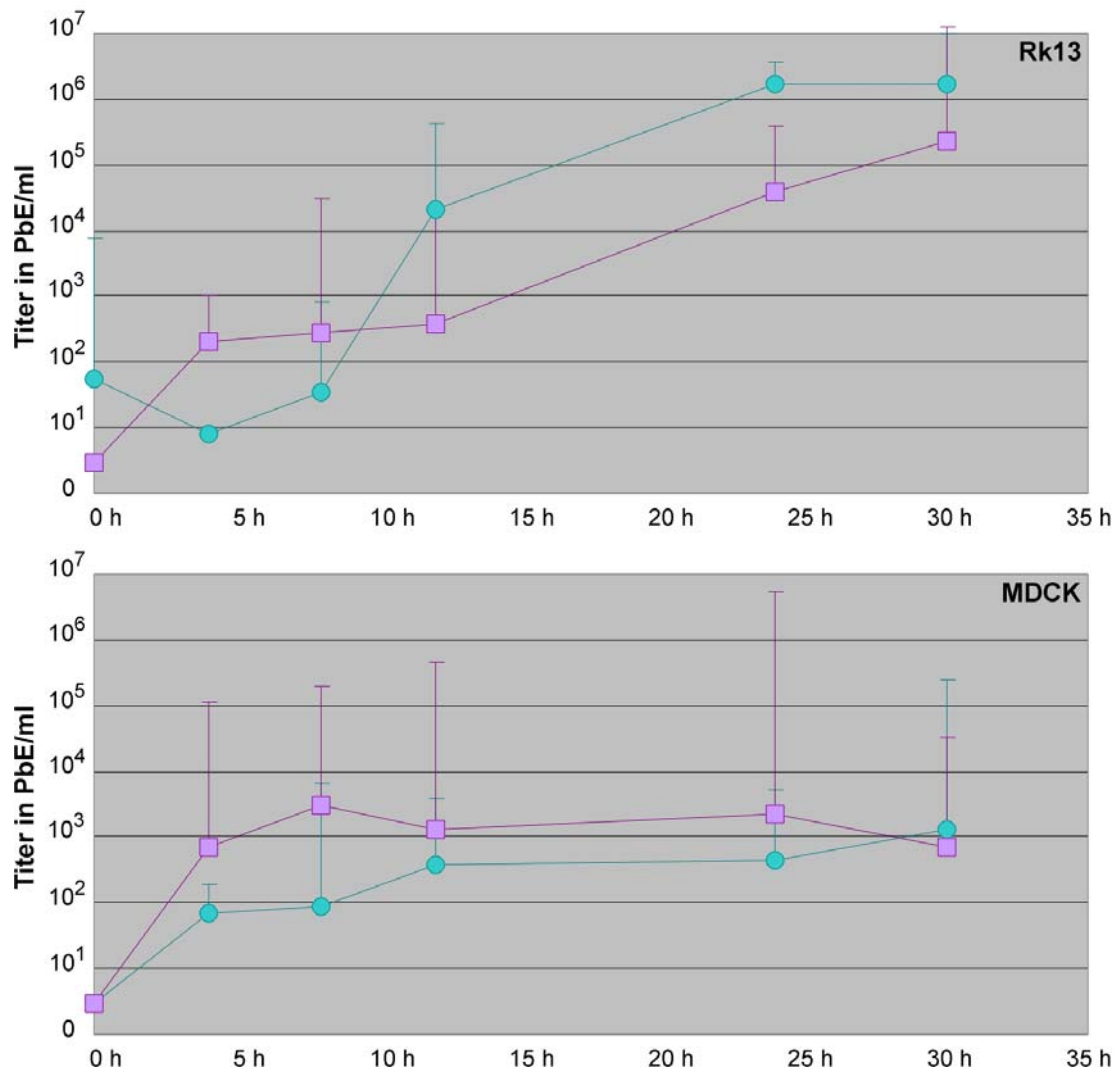


Abbildung 32: Summierte Titer nach apikaler oder nach basolateraler RaCL11-Infektion polarisierter Rk13- und MDCK-Zellen

Nach apikaler (—●—) bzw. nach basolateraler (—■—) Infektion wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Titer summen aus Über-, Unterstand und Zellen ermittelt und in den abgebildeten Verlaufskurven wiedergegeben. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Symbolen aufgetragen.

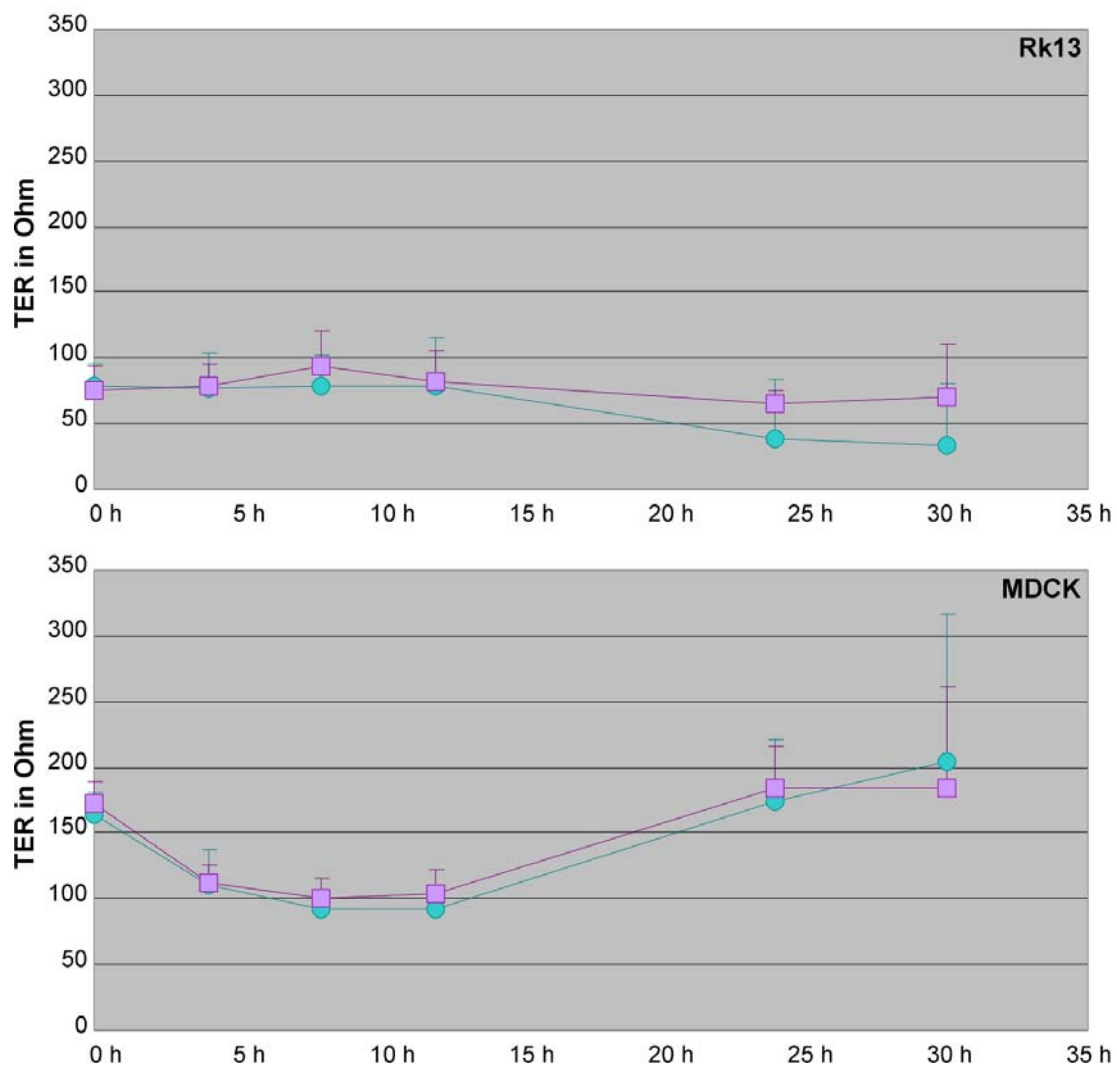


Abbildung 33: Verlauf der TER während der RacL11-Infektion polarisierter Rk13- und MDCK-Zellen

Vor der Infektion und zu jedem Zeitwert wurden die TER der Rk13- und MDCK-Zellen gemessen. Die resultierenden Kurvenverläufe für die apikalen (—●—) bzw. basolateralen (—■—) Virusapplikationen sind abgebildet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Symbolen aufgetragen.

4.2.2.3 Die Infektion polarisierter Zellen mit verschiedenen EHV-1-Deletionsmutanten

Um die Bedeutung der multipel hydrophoben Proteine, gM, pUL20, pUL43 und gK, von EHV-1 bei der Infektion polarisierter Zellen untersuchen zu können, wurden Rk13-Zellen wie in 3.2.5.2 beschrieben kultiviert. Für die Infektion (zwei PbE pro Zelle) wurden die Deletionsmutanten H Δ 43, H Δ gM und L Δ 20 (NEUBAUER et al., 1997a; GUGGEMOOS et al., im Druck) vergleichend mit den Wildtyp-Viren RacH und RacL11 verwendet. Auf eine Infektionsreihe mit H Δ gK (NEUBAUER und OSTERRIEDER, 2004) wurde zunächst verzichtet, da keine Virusstocks mit den benötigten Titern zur Verfügung standen und die Untersuchungen anhand des gK-Komplexbpartners pUL20 für erste Ergebnisse ausreichend erschienen. Als Beobachtungszeitpunkt wurde der 12 h-Wert gewählt, da wie bei 4.2.2.1 erwähnt nach diesem Zeitpunkt die TER abfielen und es dadurch zu einer Durchmischung von Über- und Unterstand kommen könnte. Über-, Unterstände und Zellen wurden separat gewonnen und durch Virustitration die Infektiosität der Proben ermittelt. Die Abbildungen 34 bis 36 zeigen jeweils die Ergebnisse nach apikaler bzw. basolateraler Virusapplikation im Vergleich zum Wildtyp-Virus. Für H Δ 43 wurden sowohl nach apikaler als auch nach basolateraler Infektion zwischen 2,2fach und 13,8fach verminderte Titer im Vergleich zu RacH für Über-, Unterstand und Zellen beobachtet (Abb. 34). Für H Δ gM waren 1,9fach bis 11fach erniedrigte Titer nach basolateraler Applikation zu verzeichnen. Nach apikaler Infektion waren dagegen die resultierenden H Δ gM-Titer um 31,6fach bis 72,4fach geringer als die des Wildtyp-Virus (Abb. 35). Die Infektionsversuche mit L Δ 20 ergaben für die apikale Infektion in Über- und Unterstand 186,2fach bis 204,2fach erniedrigte Titer im Gegensatz zum Wildtyp-Virus. Nach basolateraler Infektion waren die Virustiter generell sehr gering. Sowohl im Über- als auch im Unterstand waren 2,2fach bis 3fach höhere Titer von L Δ 20 zu verzeichnen als vom Wildtyp-Virus. Die intrazellulären Titer von L Δ 20 waren nach apikaler und basolateraler Virusapplikation verglichen mit RacL11 um 2,8fach bis 11,6fach vermindert (Abb. 36).

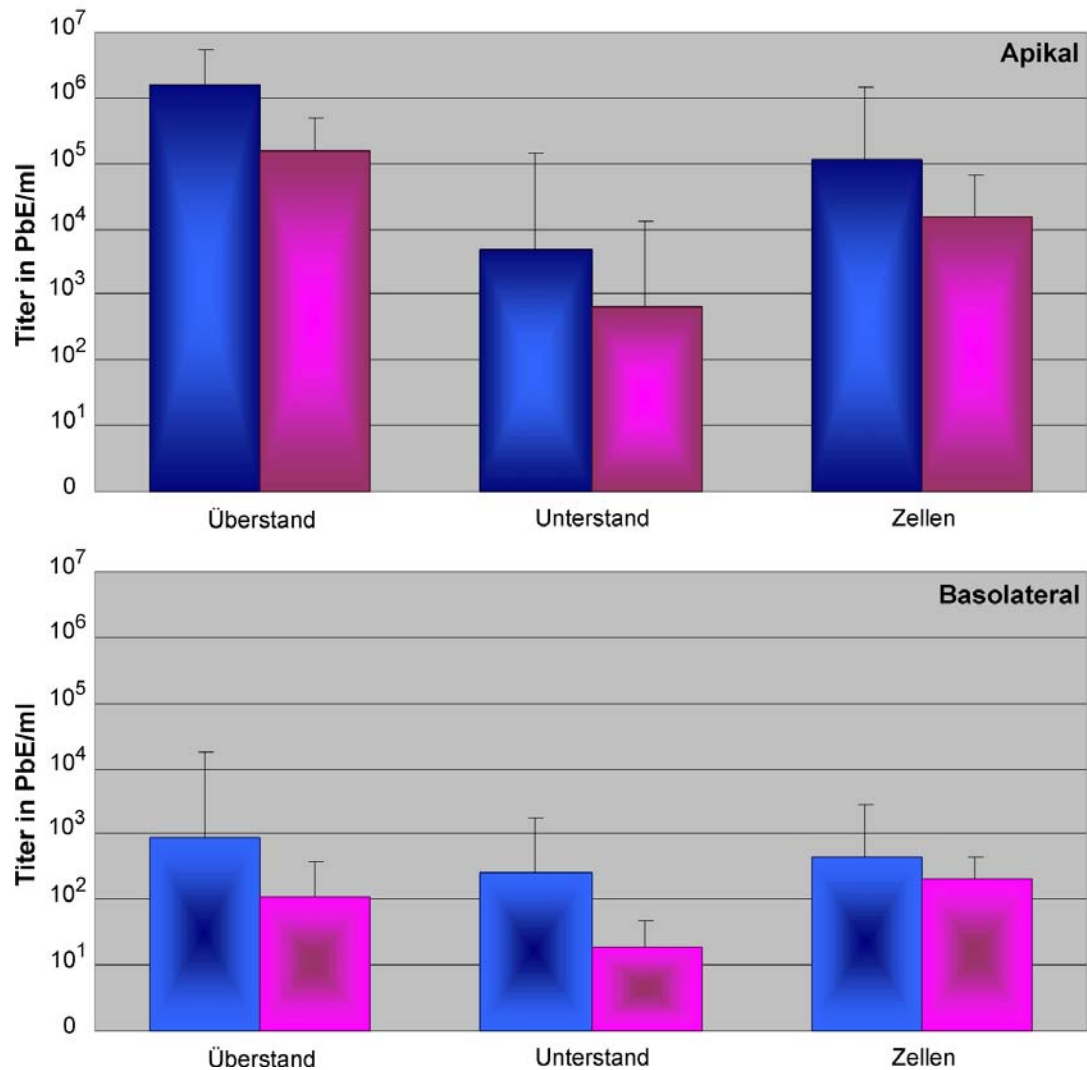


Abbildung 34: Infektion polarisierter Rk13-Zellen mit RacH und HΔ43

Auf Filtern kultivierte Rk13-Zellen wurden von apikal oder von basolateral mit RacH (■) und HΔ43 (■) infiziert und die 12 h p. i. entstandenen Infektiositäten in Über-, Unterstand und Zellen ermittelt. Zur Datenermittlung wurden drei unabhängige Versuche ausgewertet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Balken aufgetragen.

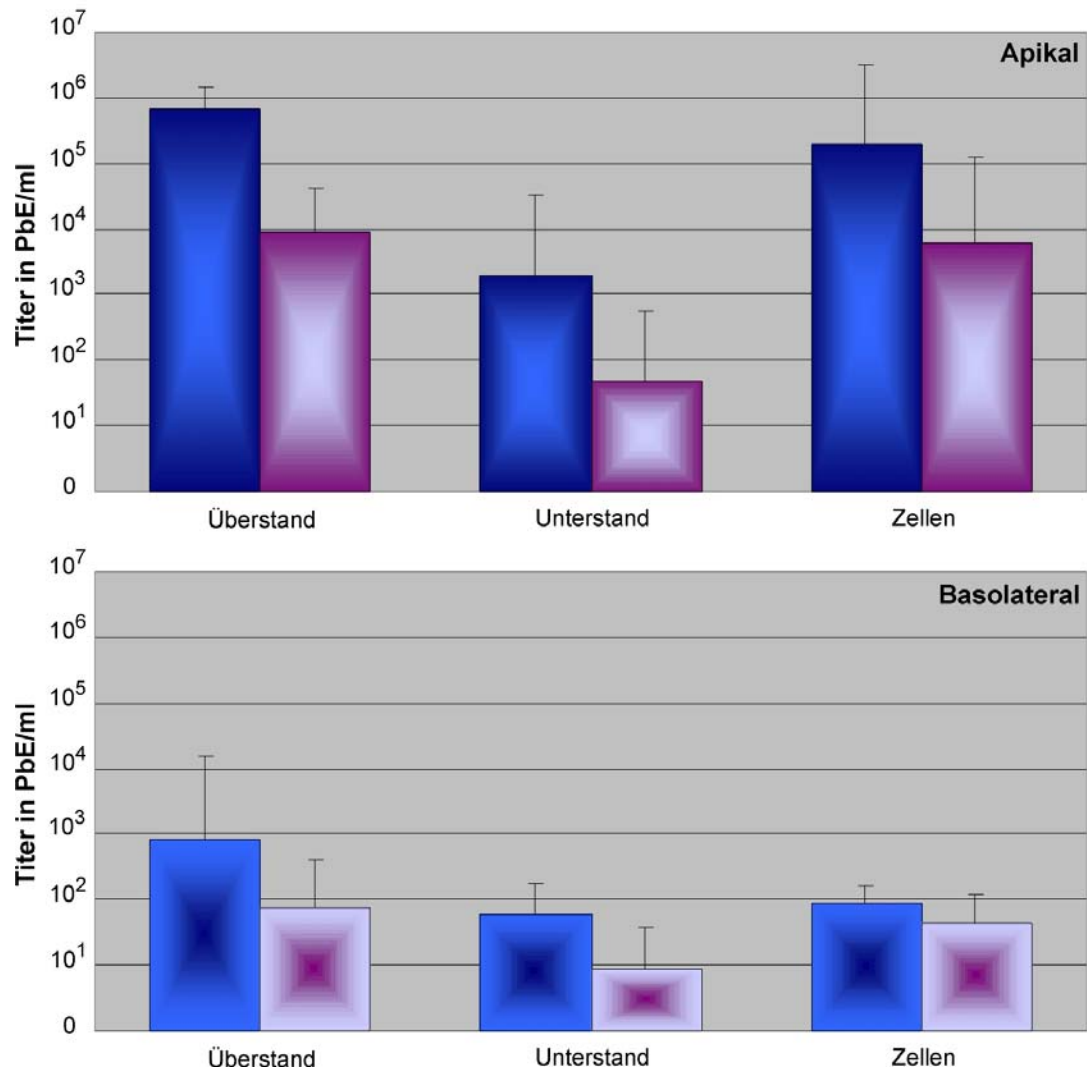


Abbildung 35: Infektion polarisierter Rk13-Zellen mit RacH und HΔgM

Bei der polarisierten Infektion mit RacH (■) und HΔgM (■) konnten nach Bestimmung der Infektiositäten von Über-, Unterstand und Zellen die abgebildeten Diagramme erstellt werden. Zur Datenermittlung wurden drei unabhängige Versuche ausgewertet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Balken aufgetragen.

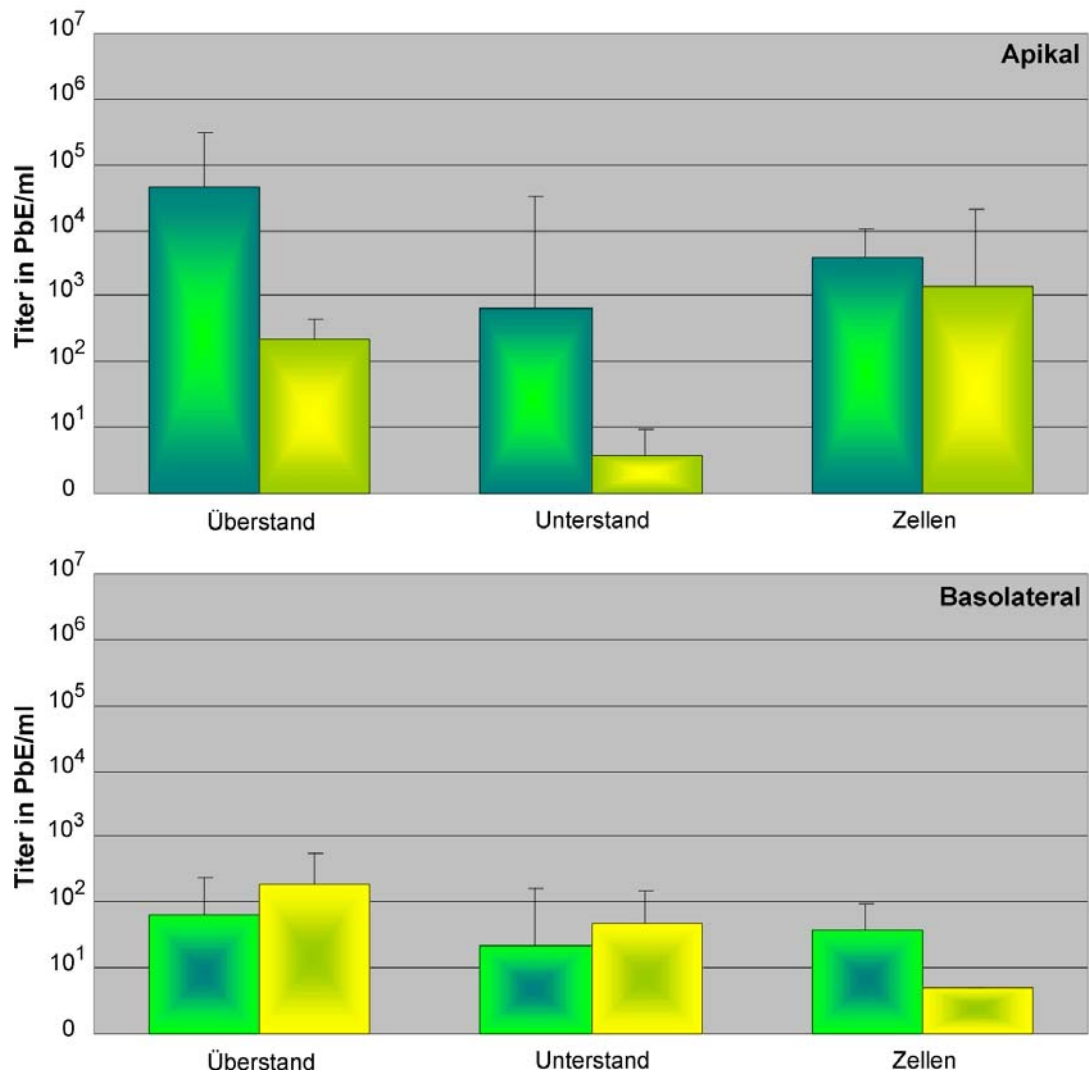


Abbildung 36: Infektion polarisierter Rk13-Zellen mit RacL11 und LΔ20

Die Ergebnisse der Infektion polarisierter Rk13-Zellen mit RacL11 (■) und LΔ20 (■) sind anhand von Balkendiagrammen dargestellt. Zur Datenermittlung wurden drei unabhängige Versuche ausgewertet. Die Standardabweichungen sind über den jeweiligen Balken aufgetragen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der viralen, multipel hydrophoben Proteine auf die Replikation des EHV-1 in polarisierten Zellen untersucht werden.

EHV-1 kodiert für vier multipel hydrophobe Proteine, von denen drei bereits identifiziert und charakterisiert waren. Das Vierte, das EHV-1 UL43-Homolog war dagegen zu Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht. Allein über die UL43-Homologen von HSV-1, PRV und EBV lagen erste Studien vor. Für das EHV-1 sollte nun auch ein UL43-Produkt identifiziert und dessen Funktion charakterisiert werden. Um eine Rolle in der Replikation des Virus im polarisierten Zellverband abzuklären, wurden zusätzlich funktionelle Untersuchungen in polarisierter Zellkultur unternommen.

Zu diesem Zweck wurde mit zweierlei Zelllinien gearbeitet. Die Polarisierbarkeit der mit EHV-1 gut zu infizierenden und in der Routine verwendeten Zelllinie Rk13 sollte charakterisiert werden, um diese Zellen möglicherweise weiterhin auch als Modell der polarisierten Infektion nutzen zu können. Für die *in vitro* bekanntermaßen deutlich polarisierte Zelllinie MDCK stand dagegen die Untersuchung der Infizierbarkeit mit EHV-1 im Mittelpunkt, über die es noch kaum Anhaltspunkte gab.

Abschließend sollte die Funktion aller multipel hydrophoben Proteine von EHV-1 in polarisierter Zellkultur untersucht werden.

5.1 Das UL43-Protein von EHV-1

Zur Identifizierung des UL43-Produktes wurde versucht, mit zwei verschiedenen, bakteriell exprimierten relativ wenig hydrophoben Segmenten des abgeleiteten UL43-Polypeptides ein UL43-spezifisches Serum in Kaninchen herzustellen. Die gewonnenen Seren ließen allerdings keine spezifische Reaktivität mit EHV-1-infizierten Zellen oder TCGFPC43-Zellen erkennen. Es kann daher angenommen werden, dass im UL43-Polypeptid keine Domäne mit ausreichender Antigenität vorhanden ist. Geringe Expressionsraten würden eine Detektion ebenfalls erschweren. Ähnliche Schwierigkeiten bei der Antiserumgewinnung wurden bereits für HSV-1 beschrieben, für das ebenfalls bis heute kein UL43-spezifisches Serum generiert werden konnte (MACLEAN et al., 1991; CARTER et al., 1996). Für das homologe UL43-Produkt des PRV gelang dies, ebenfalls über bakterielle Expression eines GST-fusionierten, hydrophilen Segmentes des UL43-Polypeptides (KLUPP et al., 2005). Auch für andere multipel hydrophobe Protein-Homologe war die Gewinnung spezifischer Antikörper erschwert und gelang dabei nur in manchen Virussystemen. So wurden für HSV-1 und EHV-1 pUL20-spezifische Antiseren generiert und für PRV nicht (WARD et al., 1994; DIETZ et al., 2000; GUGGEMOOS et al., im Druck).

Mit Hilfe der generierten, rekombinanten Zelllinie TCGFPC43, die das UL43-Produkt als GFP-Fusionsprotein exprimiert, konnte das EHV-1 pUL43 indirekt identifiziert werden. In einem ersten Ansatz wurde die Zelllinie im Western Blot untersucht. Unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers konnten in Zelllysaten der TCGFPC43-Zellen zwei GFP-spezifische Banden detektiert werden, deren Laufhöhen mit einem Präzisionsmarker bestimmt wurden. Das am schnellsten laufende Protein bei ca. 27 kDa entsprach dem erwarteten apparenten Molekulargewicht des GFP und könnte durch Degradation des Fusionsproteins entstanden sein. Die andere Reaktivität schien GFPC43-spezifisch zu sein. Bei ca. 43 kDa lief ein Protein, das als mögliches GFPC43 um 27 kDa kleiner erschien, als es das berechnete Molekulargewicht von 70 kDa (27 kDa + 43 kDa) beider Fusionspartner erwarten ließ. Eine Erklärung für die veränderten Laufeigenschaften des Fusionsproteins könnte möglicherweise eine ungenügende Linearisierung nach SDS-Denaturierung des GFPC43 sein. In Hitze-denaturierten TCGFPC43-Lysaten konnte diese 43 kDa Bande nicht mehr detektiert werden. Durch Hitze aggregieren stark hydrophobe Proteine, können nicht mehr in der SDS-PAGE aufgetrennt werden und bleiben zwischen Sammel- und Trenngel hängen. Diese Beobachtung bestätigte den erwarteten, stark hydrophoben Charakter des GFPC43. Die erwähnten GFPC43-spezifischen Banden traten auf selber Höhe ebenfalls in EHV-1-infizierten TCGFPC43-Zellen auf. In diesem Detektionssystem konnte also auch nach Infektion keine Modifikation des GFPC43 erkannt werden.

In aufgereinigten H Δ 43-Virionen mit inkorporiertem GFPC43 war, ebenfalls mit einem Präzisionsmarker gemessen, eine weitere GFPC43-reaktive Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa zu detektieren. Diese könnte auf eine Komplexbildung mehrerer GFPC43-Moleküle hinweisen, die zu Oligomeren verbunden sind. Da, wie bereits beschrieben, das GFPC43-Einzelmolekül veränderte Laufeigenschaften im Verhältnis zur berechneten Größe aufwies, würden sich voraussichtlich auch mögliche Di- oder Trimere nicht entsprechend der berechneten Molekulargewichte im Trenngel positionieren. Möglich wäre aber auch eine Interaktion mit einem oder mehreren anderen viralen Proteinen, wie dies für die anderen multipel hydrophoben Proteine des EHV-1, gK und pUL20 oder gM mit pUL49,5, beschrieben ist (SEYBOLDT et al., 2000; RUDOLPH et al., 2002; GUGGEMOOS et al., im Druck).

Die Untersuchung des GFPC43-Fluoreszenzmusters innerhalb der TCGFPC43-Zellen konnte ebenfalls Hinweise auf die funktionelle Bedeutung des pUL43 geben. Dazu wurden sowohl TCGFPC43-Zellen mit wenigen Zellkontakten als auch solche im dichten Zellverband unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In wenig polarisierten TCGFPC43-Zellen waren Fluoreszenzsignale des GFPC43 in granulärer bis vesikulärer Form im Zytoplasma zu beobachten. Mit zunehmender Dichte des Zellrasens wurde eine zusätzliche Lokalisation der GFPC43-Fluoreszenz an Kontaktseiten zu benachbarten Zellen bemerkt. Auch nach Infektion dieser Zellen konnte ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet werden. Diese Fluoreszenzbeobachtungen können jedoch nur als Anhaltspunkte für die intrazelluläre Verteilung des authentischen pUL43 gelten. Da GFPC43 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht, ist es wahrscheinlich, dass das Fusionsprotein in einem anderen zeitlichen Rahmen und in einer veränderten Intensität exprimiert wird, als es pUL43 unter dem eigenen Promotor im Laufe einer Infektion würde.

Zur genaueren Bestimmung der subzellulären GFPC43-Lokalisation wurden Antikörper verwendet, die bestimmte zelluläre Strukturen detektieren. Dabei konnten Koloalisationen des GFPC43 mit dem *trans*-Golgi Netzwerk (TGN)-Protein γ -Adaptin und mit dem Adherens Junctions (AJ)-Protein β -Catenin festgestellt werden.

Das TGN dient u. a. im Transportweg synthetisierter Proteine als Sortierungsstation der polarisierten Zelle. Dabei werden Zielinformationen in der Struktur der Proteine erkannt und diese daraufhin in Vesikeln gerichtet versandt. Während einer EHV-1-Infektion werden auch virale Proteine im TGN in Transportvesikel sortiert. Außerdem findet hier die finale Umhüllung der Viruspartikel mit TGN-Membranen statt. Über die Erkennung von Sortierungssignalen, die möglicherweise in der Virushülle vorhanden sind, könnten auch die reifen Virionen in gerichteten TGN-Vesikeln zur Plasmamembran transportiert werden.

Die Lokalisation des GFPC43 im TGN könnte u. a. darauf zurück zu führen sein, dass es als Membranprotein durch die Sortierungsmechanismen des TGN in Richtung Zielmembran entsandt wird. Zusätzlich werden im TGN die unbehüllten Nukleokapside mit weiteren viralen Strukturproteinen zu reifen Viruspartikeln zusammengesetzt. Als Bestandteil der Virionen ist die TGN-Lokalisation des GFPC43 somit auch dadurch begründbar. Könnte es der Virushülle zugeordnet werden, könnte das GFPC43 hier eine richtungsweisende Rolle spielen. Durch Interaktion einer zytoplasmatischen Domäne des Fusionsproteins mit der Sortierungsmaschinerie des TGN könnten mit dessen Hilfe die behüllten Virionen zielgerichtet in Transportvesikel verpackt und transportiert werden. Die beschriebene Assoziation des GFPC43 mit dem TGN ließ eine Beteiligung des pUL43 am „Egress“ bzw. am „Cell-to-Cell Spread“ vermuten.

Nach Ausbildung eines dichten polarisierten Zellverbandes konnte außerdem eine Kolokalisation des GFPC43 mit dem AJ-Protein β -Catenin an der lateralen Zellmembran beobachtet werden. Die AJ sind Zellverbindungsstrukturen, die aus Komplexen verschiedener Bindungspartner mit den AJ-assoziierten Cadherinen bestehen und basal der Tight Junctions (TJ) entlang der gesamten lateralen Zellmembran verteilt vorliegen. β -Catenin ist eine der zytoplasmatischen Komponenten dieses Komplexes und verankert die AJ am Actin-Zytoskelett.

Grundsätzlich konnte für das GFPC43 angenommen werden, dass es als Fusionsprotein mit multipel hydrophober Transmembrandomäne in zellulären Membranen zu finden sein könnte. Was bereits durch die Zellfraktionierung der TCGFPC43-Zellen belegt werden konnte. Die Kolokalisation mit β -Catenin weist zusätzlich auf eine Lokalisation in der Plasmamembran genauer noch auf eine Lokalisation im Bereich der AJ hin. Es müssen folglich in der AS-Sequenz des GFPC43 Sortierungssignale vorhanden sein, durch die das Fusionsprotein im TGN nach basolateral versandt wird und in AJ-Nähe akkumuliert.

Es wird vermutet, dass Zellverbindungsstrukturen einen zentralen Ort für den „Cell-to-Cell Spread“ darstellen könnten. Mit Hilfe fusogener viraler Proteine könnte es dabei zur Verschmelzung der Plasmamembranen benachbarter Zellen kommen und infektiöse Partikel könnten so in nicht-infizierte Zellen gelangen. Nach einem anderen Modell stellen diese Zellkontakte Zielorte für virale Proteine und zugleich Virionen-beladene Transportvesikel dar, an denen eine Freisetzung infektiöser Virionen in den Zwischenzellraum möglich wird. Eine Beteiligung des pUL43 am „Cell-to-Cell Spread“ basierend auf einer der erwähnten Theorien könnte aufgrund der AJ-Assoziation des GFPC43 vorgeschlagen werden.

Vergleichbare Überlegungen wurden bereits für den gE/gI-Komplex des HSV-1 geführt (JOHNSON und FEENSTRA, 1987; DINGWELL und JOHNSON, 1998), was auf ähnliche Rollen von HSV-1 gE/gI und EHV-1 pUL43 im Replikationszyklus hinweisen könnte. In der frühen Phase der Infektion akkumuliert HSV-1 gE/gI im TGN und kolokalisiert später mit dem β -Catenin der AJ. Mögliche Bedeutungen könnte der Komplex daher u. a. in der finalen Umhüllung der Nukleokapside und in der Sortierung behüllter Virionen nach lateral, durch Interaktion zytoplasmatischer Domänen der Proteine mit der zellulären Sortierungsmaschinerie, haben (JOHNSON et al., 2001). Die basolaterale Ansammlung in der späteren Phase der Infektion könnte dann zusammen mit anderen evtl. viralen Faktoren, durch Interaktion mit den AJ, den Transfer von Viruspartikeln in den parazellulären Raum ermöglichen (DINGWELL und JOHNSON, 1998).

Für EHV-1 sind diese Zusammenhänge und die zelluläre Lokalisation des gE/gI-Komplexes noch nicht genau untersucht. Wahrscheinlich ist aber, dass gE/gI hier eine vergleichbare Funktion übernimmt. pUL43 könnte dabei durchaus eine unterstützende Rolle gemeinsam mit dem gE/gI-Komplex im „Egress“ bzw. „Cell-to-Cell Spread“ spielen.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die mögliche Assoziation des GFPC43 mit den Lipid Rafts in der Zellmembran untersucht. Das EHV-1 pUL11, dem bereits eine Rolle im „Cell-to-Cell Spread“ nachgewiesen wurde, assoziiert mit Lipid Rafts, was vermuten ließ, dass Lipid Rafts selbst eine Rolle im „Cell-to-Cell Spread“ spielen könnten (GUGGEMOOS, 2004). Lipid Rafts sind cholesterol- und glykosphingolipidreiche Membranmikrodomänen, die in Triton X-100 unlöslich sind. In den hier ausgewerteten Präparationen wurden nicht-infizierte und für 18 h mit H Δ 43 infizierte TCGFPC43-Zellen verwendet und die Lipid Raft-assoziierten Proteine von den löslichen nicht-assoziierten durch Flotation getrennt. Für GFPC43 konnte allerdings keine spezifische Lipid Raft-Assoziation detektiert werden.

Da diese initialen Untersuchungen nur eine Momentaufnahme der Infektion nach 18 h darstellten, ist es wiederum noch nicht möglich eine endgültige Aussage über Veränderungen in der GFPC43-Verteilung im Laufe der Infektion zu treffen. Außerdem wurden hier GFPC43-exprimierende Zellen mit einem UL43-negativen Virus infiziert, was die Begebenheiten in einer Wildtyp-infizierten Zelle nur im Ansatz widerspiegeln kann. In weiterführenden Untersuchungen könnten diese Beobachtungen mit Hilfe eines entsprechenden rekombinanten Virus präzisiert werden.

Zusammenfassend lassen die Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des GFC43 jedoch eine funktionelle Bedeutung beim „Cell-to-Cell Spread“, durch z. B. Interaktion mit den AJ bei der Freisetzung von Viruspartikeln aus der Zelle, vermuten.

5.2 Funktionelle Untersuchung des UL43-Proteins

Mit Hilfe der BAC-Mutagenese wurde der gesamte UL43-Leserahmen aus dem EHV-1-Genom entfernt und die Wachstumseigenschaften des entstandenen rekombinanten Virus H Δ 43 vergleichend mit dem Ausgangsvirus RacH in Zellkultur untersucht. Grundsätzlich ist zu bemerken, dass pUL43 für die Replikation von EHV-1 in Zellkultur nicht essentiell war, da sich H Δ 43 auch in Zellen, die kein pUL43 exprimierten, replizieren konnte.

Beim initialen Kontakt mit EHV-1 adsorbiert das Virus an der Zelle, indem verschiedene virale Proteine, wie beispielsweise gC, mit Komponenten der Plasmamembran interagieren. Nach Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran, woran u. a. die Glykoproteine B, C, D und M beteiligt sind, wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma freigesetzt (OSTERRIEDER et al., 1996; NEUBAUER et al., 1997; OSTERRIEDER, 1999; CSELLNER et al., 2000).

Um den Einfluss des pUL43 auf einen dieser ersten Schritte im Replikationszyklus zu bestimmen, wurden die Penetrationseigenschaften von H Δ 43 im Vergleich zu RacH untersucht. Dabei konnten keine spezifischen Abweichungen im resultierenden Kurvenverlauf beobachtet werden, wodurch eine Beteiligung des pUL43 an der Penetration von EHV-1 auszuschließen ist.

Erste Anhaltspunkte für eine funktionelle Einordnung in einen der intrazellulären Schritte während einer EHV-1-Infektion können durch die Ermittlung der intrazellulären Infektiosität erhalten werden. Da nur behüllte Virionen, wahrscheinlich sogar nur reife Virionen, infektiös sind, können die ermittelten Titer grobe Hinweise auf das Stadium geben, in dem das zu untersuchende Protein seine Funktion entfaltet. Verminderte intrazelluläre Titer deuten auf eine Funktion vor der endgültigen Umhüllung hin, da in diesem Fall entweder geringere Mengen infektiöser Viruspartikel oder Partikel mit einer geringeren Infektiosität gebildet werden. Sind die intrazellulären Titer des zu untersuchenden Virus allerdings im Gegensatz zu denen des Wildtyp-Virus erhöht, weist dies auf eine Akkumulation infektiöser Virionen in der Zelle und damit auf eine Beeinträchtigung bei der Freisetzung aus der Zelle hin.

Für H Δ 43 ergaben sich intrazellulär vergleichsweise um das 1,3fache bis 6,6fache verminderte Titer. pUL43 hat also eine zumindest unterstützende Rolle in den Vorgängen vor der finalen Umhüllung. Über die genaue Phase zwischen Penetration und finalem „Egress“ kann so allerdings keine Aussage gemacht werden. Lediglich die unveränderte Expression anderer, auch γ_2 -Proteine, wie in der IIF und im Western Blot gezeigt, weist auf einen ungestörten Ablauf bis zur Synthese dieser Proteine hin. In Anbetracht der zuvor diskutierten subzellulären Lokalisation des GFPC43 im Bereich des TGN könnte der von pUL43 beeinflusste Schritt die sekundäre Umhüllung der Nukleokapside sein, die nach UL43-Deletion weniger effektiv stattfinden würde.

Nach Andocken Virus-beladener Transportvesikel und Fusion von Vesikel- und Zellmembran werden Tochterviren aus der Zelle freigesetzt. Vergleichende extrazelluläre Titer können darüber Aufschluss geben, inwiefern diese Vorgänge durch das Fehlen eines viralen Proteins beeinträchtigt werden. Die ermittelten Ergebnisse für H Δ 43 und RacH ergaben für die Deletionsmutante eine 1,4fache bis 9,3fache Reduktion der extrazellulären Titer. Da die ermittelten Werte in etwa denen der intrazellulären Infektiositäten entsprachen, können die extrazellulären Ergebnisse als Folge der intrazellulären Reduktion gewertet werden. Es erscheint deshalb wenig wahrscheinlich, dass durch die UL43-Deletion ein Mechanismus beim finalen „Egress“ infektiöser Virionen betroffen ist.

Hinweise auf die Fähigkeiten eines Virus zur Ausbreitung von Zelle zu Zelle können durch Untersuchungen des Plaquephänotyps gewonnen werden. Unter optimalen Bedingungen breitet sich die Infektion intrazellulär effektiv von infizierten zu nicht-infizierten Zellen aus. Die Effektivität dieses Vorgangs spiegelt sich dann in der Größe der unter Plaqueassay-Bedingungen gebildeten Plaques wider. Um in dieser Phase der Virusinfektion Veränderungen durch die UL43-Deletion feststellen zu können, wurden Rk13-Zellen sowohl mit H Δ 43 als auch RacH infiziert und die gebildeten Plaques dokumentiert und vermessen. Der selbe Versuchsaufbau mit TCGFPC43-Zellen sollte eine Komplementierung der UL43-Deletion zeigen.

Auf nicht-komplementierenden Zellen wurde unabhängig von der Dichte des zu infizierenden Zellrasens eine Flächenreduktion der H Δ 43-Plaques von 25 % beobachtet. Wurden über einen Tag gewachsene TCGFPC43-Zellen infiziert, betrug diese Verkleinerung noch 16 %. Mit zunehmender Dichte der komplementierenden Zellen glichen sich die Plaquegrößen einander an und es wurde nur noch eine Differenz von 6 % verzeichnet.

Ergänzend zu den Überlegungen über die subzelluläre Lokalisation des GFPC43 weist also auch die Untersuchung des Plaquephänotyps auf eine Beteiligung des pUL43 am „Cell-to-Cell Spread“ hin.

Im polarisierten Zellverband über drei Tage kultivierter TCGFPC43-Zellen konnte eine gute Komplementierung (94 %) erreicht werden, was einen effizienten „Cell-to-Cell Spread“ widerspiegelt. Da dieser Komplementierungseffekt bei den über einen Tag gewachsenen TCGFPC43-Zellen geringer ausfiel, scheint die Polarisation der TCGFPC43-Zellen die Ausbildung der H Δ 43-Plaques zu begünstigen. Dabei könnte die bereits besprochene AJ-Assoziation des GFPC43 im polarisierten Zellverband eine wichtige Rolle spielen. Durch die verstärkt membranale GFPC43-Lokalisation in den über drei Tage gewachsenen Zellen können sich die gebildeten infektiösen Viruspartikel offensichtlich besser von Zelle zu Zelle ausbreiten. Dabei könnte der Weg der Virusweitergabe an das GFPC43 in AJ-Assoziation gekoppelt sein. Diese Beobachtungen betonen wiederum die funktionelle Bedeutung des pUL43 an Vorgängen des „Cell-to-Cell Spreads“.

Während einer EHV-1-Infektion kann es durch Fusionsprozesse zwischen den Plasmamembranen infizierter Zellen zur Bildung von Synzytien kommen. Dieses Phänomen ist in Infektionen mit dem synzytialen RaCH-Stamm besonders ausgeprägt. Die dokumentierten Plaques waren auch bei H Δ 43 sowohl auf komplementierenden als auch auf nicht-komplementierenden Zellen deutlich synzytial. Offensichtlich hatte das Fehlen des pUL43 keinerlei Auswirkungen auf die beschriebenen Fusionsprozesse und die Bildung von Synzytien durch RaCH. Eine weitere Charakterisierung des Einflusses des pUL43 auf die Synzytienbildung könnte durch eine UL43-Deletion in einem nicht-synzytialen EHV-1-Stamm untersucht werden. So könnte auch die Frage beantwortet werden, ob das pUL43 eine Rolle in der Fusions-Inhibierung im nicht-synzytialen Hintergrund spielt. Diese Fragestellung ist insofern interessant, da von PRV bekannt ist, dass das pUL43, wie auch andere multipel hydrophobe Proteine bei PRV, HSV-1 und auch EHV-1, eine Rolle in der Fusions-Inhibierung in einem entsprechenden *in vitro*-Assay übernimmt (DIETZ et al., 2000; KLUPP et al., 2000 und 2005; AVITABILE et al., 2004; CRUMP et al., 2004). Es könnte sich dabei möglicherweise um verwandte Rollen der multipel hydrophoben Proteine im Infektionsgeschehen handeln.

5.3 Polarisation und Infektion

Der Vergleich der Polarisierbarkeit von Rk13-Zellen mit der von definiert polarisierten MDCK-Zellen erfolgte zunächst mit Hilfe sogenannter Polarisationsmarker. Dies sind Proteine der Zellverbindungsstrukturen, die wichtige Bestandteile eines polarisierten Zellverbandes sind. In nicht-polarisierten Zellen können diese Proteine frei in der Zelle verteilt vorliegen. Während der Polarisation sammeln sie sich an den Kontaktseiten zu benachbarten Zellen an und bilden hier die Zellverbindungsstrukturen des Zellverbandes aus. Zu diesen zählen v. a. die TJ und die AJ, deren assoziierte Proteine ZO-1 und β -Catenin mit Hilfe von speziellen Antikörpern dargestellt werden können.

Im dichten Zellverband konnten in den Rk13-Zellen die gleichen den TJ und AJ assoziierten Proteine wie in den MDCK-Zellen angefärbt werden. Über die Funktionalität der untersuchten Strukturen konnten allerdings keine detaillierten Aussagen gemacht werden. Dies zeigte, dass Rk13-Zellen ähnliche Zellverbindungsstrukturen wie MDCK-Zellen ausbilden, allerdings mit noch unbestimmter Funktionalität. Aus den Untersuchungen im Transwell®-Filtersystem konnten weitere Hinweise zur Polarisierbarkeit von Rk13-Zellen gewonnen werden. Die über drei Tage kultivierten Rk13-Zellen bildeten Zellverbände mit deutlichen transepithelialen Widerständen (TER). Zudem fand kein Mediumaustausch zwischen innerem und äußerem Kompartiment mehr statt, was wiederum auf die Ausbildung von Zellverbindungsstrukturen hinweist und zusätzlich deren Funktionalität annehmen lässt.

Zusammengenommen lassen die aufgeführten Beobachtungen für Rk13-Zellen einen gewissen Grad an Polarisation vermuten.

Um eine Aussage über die Replikation von EHV-1 in polarisierten Zellen treffen zu können, wurden Rk13- und MDCK-Zellen verwendet. Rk13-Zellen waren in der Zellkultur für Arbeiten mit EHV-1 gut etabliert, während noch wenig Anhaltspunkte über die Replikation von EHV-1 in MDCK-Zellen vorlagen.

Im ersten Ansatz wurden über drei Tage kultivierte Rk13- und MDCK-Zellen mit H Δ gp2 (zwei PbE pro Zelle), einem rekombinanten, GFP-exprimierenden Virus (RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002), von apikal infiziert und die Zellen nach 6 h oder 24 h fixiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte bei den Rk13-Zellen bereits 6 h p. i., anhand der GFP-Expression, ein gleichmäßig infizierter Zellrasen beobachtet werden. Im Zellverband der MDCK-Zellen waren dagegen selbst 24 h p. i. kaum GFP-exprimierende Zellen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss daran wurde der Zellrasen über drei Tage gewachsener Rk13- und MDCK-Zellen mit einer artifiziellen Unterbrechung versehen, um in diesem Bereich eine Virusapplikation von basolateral zu ermöglichen. 6 h nach Infektion der Rk13-Zellen konnten hier wiederum über den gesamten Zellrasen verteilt infizierte Zellen beobachtet werden. Bei den MDCK-Zellen dagegen waren im selben Zeitfenster nur entlang der artifiziellen Unterbrechung infizierte Zellen zu finden. 48 h p. i. waren dagegen auch im Zellrasen der MDCK-Zellen viele infizierte Zellen zu dokumentieren.

MDCK-Zellen sind folglich mit EHV-1 infizierbar und scheinen auch eine Replikation von EHV-1 zu ermöglichen. Bei dieser Zelllinie scheint allerdings die Anheftung und Penetration der Viruspartikel über die basolaterale Plasmamembrandomäne wesentlich effektiver zu sein als über die apikale. Sind daraufhin Zellen infiziert, scheint sich die Infektiosität vornehmlich intrazellulär ausgehend vom Infektionsherd auszubreiten - also wiederum über die basolaterale Zellseite. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass für die Adsorption und Penetration von EHV-1 relevante zelluläre Rezeptoren, die offensichtlich in der gesamten Zellmembran von Rk13-Zellen verteilt vorliegen, bei MDCK-Zellen nur basolateral vorhanden sind.

In Infektionsversuchen mit HSV-1, bei denen MDCK- und Humane Retinalpigment Epithel (RPE)-Zellen sowohl von apikal als auch von basolateral infiziert wurden, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. RPE-Zellen waren beidseits gleich gut zu infizieren. MDCK-Zellen dagegen weitaus effektiver von basolateral. Es konnte ein Rezeptor benannt werden, der bei MDCK-Zellen nur basolateral und bei RPE-Zellen in der gesamten Zellmembran vorkommt, und eine Erklärung für dieses Phänomen liefern könnte (TOPP et al., 1997). Wahrscheinlich werden aber von EHV-1 und HSV-1 nicht die gleichen Rezeptoren bzw. Ko-Rezeptoren genutzt.

Alternativ wäre es im Falle der MDCK-Infektion nach artifizieller Unterbrechung des Zellrasens auch denkbar, dass erst durch die EHV-1-Replikation in MDCK-Zellen, die in dieser Zellart gebildeten Tochterviren die Fähigkeit erlangt haben, nicht-infizierte MDCK-Zellen auch von apikal infizieren zu können.

Zusammenfassend ist die Replikation von EHV-1 auch in definiert polarisierten MDCK-Zellen zwar möglich, in wie fern diese allerdings mit der in Rk13-Zellen vergleichbar ist, muss weiter untersucht werden. Generell waren die in diesem System erhaltenen Virustiter sehr gering (Daten nicht gezeigt).

Um die Bedeutung der Applikationsseite für eine EHV-1-Infektion der Zellen detaillierter untersuchen zu können, wurden in weiterführenden Untersuchungen Rk13- und MDCK-Zellen im Transwell®-Filtersystem kultiviert. Dieses System ermöglicht es, die Zellen gezielt von apikal oder von basolateral zu infizieren. Innerhalb von drei Tagen entstand auf den Filtern ein dichter Zellverband, dessen Polaritätsgrad mit Hilfe von TER-Messungen und Mediumstandsbeobachtungen kontrolliert wurde. Trotz offensichtlicher Polarisierung beider Zelllinien waren deutliche Differenzen zwischen den TER zu beobachten. MDCK-Zellen bildeten dabei bis zu 90 Ohm höhere TER aus als Rk13-Zellen. Ein Mediaumaustausch zwischen innerem und äußerem Kompartiment fand in beiden Zellsystemen nicht mehr statt. Die so polarisierten Zellen wurden entweder von apikal oder von basolateral mit RacL11 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 12, 24 und 30 h p. i.) wurden die TER gemessen und im Anschluss Über-, Unterstand und Zellen separat zur Titerbestimmung gewonnen.

Die im Laufe der Infektion beobachteten TER-Änderungen der beiden Zelllinien unterschieden sich deutlich. Die TER der Rk13-Zellen blieben bis 12 h p. i. nahezu konstant und fielen zwischen 12 h und 24 h p. i. ab. Für die MDCK-Zellen konnte ein eher entgegengesetzter Verlauf verzeichnet werden. Bis 12 h fiel der TER. Danach konnte ein deutlicher TER-Anstieg beobachtet werden, der bis 30 h p. i. sogar über den Ausgangswert hinausging.

Die ermittelten Virustiter der Über-, Unterstände und Zellen wurden ausgewertet und in Wachstumskurven dargestellt. In den ersten 12 h p. i. konnte, sowohl nach apikaler als auch nach basolateraler Virusapplikation, ein leichter Anstieg der Infektiosität beobachtet werden, der bei beiden Zellarten ähnlich stark ausgeprägt war. Ab 12 h p. i. stiegen die Titer der Rk13-Versuchsreihe deutlich an, während diese bei den MDCK-Zellen stagnierten. Nach apikaler Infektion der Rk13-Zellen zeigten sich 12 h p. i. im Überstand 1.202,3fach höhere Titer als nach basolateraler Virusapplikation. Diese Differenz glich sich allerdings im weiteren Infektionsverlauf wieder aus, so dass bis 30 h p. i. nur noch ein 7,5facher Unterschied zu beobachten war. Dieser Infektiositätsausgleich könnte möglicherweise auch in einer Durchmischung von Über- und Unterstand begründet sein, da ab 12 h p. i. die TER der Rk13-Zellen deutlich abfielen und somit ein polarisierter Zellverband nicht mehr gewährleistet war.

Die nach Infektion der MDCK-Zellen erhaltenen Titer zeigten bis 12 h p. i. für die basolaterale Infektion einen stärkeren Titeranstieg. Ab 12 h p. i. glichen sich dann die Kurven von apikaler und von basolateraler Infektion an. Im Allgemeinen waren allerdings die ermittelten Titer nach Infektion der MDCK-Zellen sehr gering.

Obwohl beide Zelllinien einen polarisierten Zellverband ausbilden können, unterschieden sie sich doch erheblich in ihrer Infizierbarkeit. Eine EHV-1-Infektion von Rk13-Zellen breitete sich auch in diesem Infektionsmodell, wie bereits beschrieben, progressiv über den gesamten Zellverband aus, was sich in den gemessenen Virustitern widerspiegelte. Damit verbunden war die TER-Abnahme und dementsprechend die Auflösung des polarisierten Zellrasens parallel zum Titeranstieg.

In infizierten MDCK-Zellen waren bis 12 h p. i. ähnliche Virustiter wie in den Rk13-Zellen zu beobachten. Titerberechnungen der anschließenden Zeitwerte zeigten allerdings keine weiteren Anstiege, was in einer stagnierenden Replikationstätigkeit dieser Zellen begründet sein könnte. Parallel dazu stiegen ab 12 h p. i. die TER-Werte der MDCK-Zellen wieder an. Welche zellulären Vorgänge diese Erscheinungen begründen könnten, müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Im Transwell®-Filtersystem ist es möglich die Auswirkungen einer apikalen oder basolateralen Virusinfektion zu untersuchen. Vergleicht man die Gesamtwerte aller gebildeten infektiösen Partikel aus der nach jeweiliger Applikationsseite ermittelten Infektiositätssummen aus Über-, Unterstand und Zellen, können Überlegungen über die Effizienz von apikaler oder von basolateraler Infektion gemacht werden. Nach anfänglichem Vorteil der basolateralen Applikation war ab 12 h p. i. die EHV-1-Replikation nach apikaler Infektion von Rk13-Zellen in der Summe bis zu 56,2fach effizienter. Für die MDCK-Zellen war dagegen von basolateral in den ersten 12 h p. i. ein Vorteil von 10fach bis 35fach zu erkennen, der ab 12 h p. i. auf das 3,5fache bis 5,4fache sank. Wie bereits erwähnt, könnte dies auf eine unterschiedliche Rezeptorverteilung in der Plasmamembran zurückzuführen sein.

Zusätzlich muss bedacht werden, dass die Filter mit einer Porengröße von 0,4 µm eine Infektion von basolateral wahrscheinlich behindern. Entsprechende Studien ergaben, dass Zellen auf Filtern mit der gleichen Porengröße von apikal bis zu 100fach effizienter mit Bunyaviren zu infizieren waren als von basolateral (GERRARD et al., 2002). Herpesviruspartikel, mit einem Durchmesser von ca. 100 nm, entsprechen in ihrer Größe in etwa denen der Bunyaviren, die 80 nm bis 120 nm messen. Somit kann für die polarisierte Infektion mit EHV-1 im Transwell®-Filtersystem eine vergleichbare Behinderung durch die Filtermembran angenommen werden. Bezieht man diese Tatsache mit ein, würde das für die Rk13-Zellen eine theoretische Angleichung der basolateralen Werte an die apikalen bedeuten. Entsprechend wäre dann für die MDCK-Zellen ein deutlicher Infektionsvorteil von basolateral im Gegensatz zur apikalen Infektion vorhanden. Dies würde den bereits angeführten Beobachtungen in der Fluoreszenzmikroskopie entsprechen, bei denen ebenfalls polarisierte MDCK-Zellen nach artifizierter Unterbrechung des Zellrasens deutlich besser mit EHV-1 zu infizieren waren.

Da für die multipel hydrophoben Proteine von EHV-1 eine Rolle bei der Infektion polarisierter Zellen vermutet wurde, wurden deren Deletionsmutanten im Transwell®-Filtersystem untersucht. Für die basolaterale Infektion waren maximale Volumina von 250 µl einsetzbar, was eine Untersuchung der gK-negativen Mutante HΔgK aufgrund zu geringer Titerwerte unmöglich machte. Da gK im Komplex mit pUL20 auftritt, erschienen die Ergebnisse der Experimente mit der UL20-Deletionsmutante als zunächst ausreichend.

Wie bereits beschrieben, fielen die TER der Rk13-Zellen zwischen 12 h und 24 h p. i. auf einen solch geringen Wert ab, dass eine gesicherte Polarität des Zellrasens nicht mehr gewährleistet war. Das Schwinden der Zellpolarität könnte zu einer Durchmischung von innerem und äußerem Kompartiment führen und so eine eindeutige Titerzuordnung in Über- und Unterstand verhindern. Deshalb wurde für die Wertegewinnung in diesem Infektionsmodell der für die Integrität des Zellverbandes noch unkritische Zeitpunkt von 12 h p. i. gewählt.

Über drei Tage auf Filtern gewachsene Rk13-Zellen wurden von apikal oder von basolateral mit den Deletionsmutanten HΔ43, HΔgM oder LΔ20 infiziert und 12 h p. i. die Über-, Unterstände und Zellen zur Ermittlung der Infektiositäten gewonnen.

Die Titerverhältnisse der Ausgangsviren RacH und RacL11 waren auch in dieser Reihe von Experimenten mit denen der zuvor beschriebenen, initialen Untersuchungen polarisierter Infektionen vergleichbar.

Die HΔ43-Titer ergaben keine Hinweise darauf, dass die Deletion eine Auswirkung auf die gezielte Infektion bzw. den gezielten „Egress“ im polarisierten Zellverband haben könnte. Die intrazellulären Titer sowie die der Über- und Unterstände waren nach apikaler Infektion jeweils um den Faktor 7,6 bis 9,8 reduziert, was in etwa den Titerreduktionen der Replikationsexperimente in normaler Zellkultur entsprach. Die nach basolateraler Infektion erhaltenen Titer waren insgesamt zu gering, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Im Vergleich zur apikalen Infektion konnten aber tendenziell vergleichbare Titerreduktionen von 2,2fach bis 13,8fach beobachtet werden.

Apikal mit HΔgM infizierte Zellen zeigten im Gegensatz zu RacH-infizierten Zellen intrazellulär 31,6fach reduzierte Titer. Extrazellulär waren Unterschiede im Unterstand von 39,8fach und im Überstand von 72,4fach zu beobachten. Die in einer anderen Studie durchgeführten Untersuchungen der Wachstumseigenschaften dieser gM-Deletionsmutante auf unpolarisierten Rk13-Zellen ergaben intrazellulär eine Reduktion um den Faktor 45 und extrazellulär um den Faktor 650 (ZIEGLER, 2002). Da die hier angeführten Werte im Filter-Infektionsmodell ebenfalls auf einer apikalen Applikation beruhten, schien die Replikation im polarisierten Zellverband vergleichbar. Wenn auch die Titer nach basolateraler Virusapplikation insgesamt zu niedrig waren, um eine gesicherte Aussage treffen zu können, so sind doch tendenziell die Differenzen zwischen Ausgangsvirus und Deletionsmutante zwischen 1,9fach und 11fach geringer als nach apikaler Infektion. Es könnte also ein gewisser Vorteil in der Replikation des deletierten Virus nach basolateraler Applikation im Vergleich zum Defekt nach apikaler Infektion vorgeschlagen werden. Diese Ergebnisse müssten allerdings in weiteren Experimenten bestätigt und genauere Mechanismen bestimmt werden.

Nach apikaler Infektion mit LΔ20 wurden intrazellulär 2,8fach geringere Titer für die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp-Virus ermittelt. Extrazellulär waren diese im Unterstand um 186,2fach und im Überstand um 204,2fach reduziert. In Wachstumskurven des LΔ20 auf nicht-polarisierten Rk13-Zellen konnten vergleichbare Differenzen beobachtet werden. Intrazellulär waren die LΔ20-Werte um ca. 3fach geringer als die des Wildtyp-Virus und extrazellulär waren 12 h p. i. 400fach geringere Titer angegeben (GUGGEMOOS et al., im Druck). Wie bereits für die beiden anderen untersuchten Deletionsmutanten erwähnt, sind auch hier die nach basolateraler Infektion ermittelten Titer zu gering, um sichere Aussagen treffen zu können. Trotzdem scheint überraschenderweise der „Egress“ nach basolateraler Applikation des LΔ20 deutlich weniger beeinflusst als nach apikaler Infektion.

6. Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der multipel hydrophoben Proteine des Equiden Herpesvirus 1 (EHV-1) für die Replikation in polarisierten Zellen *in vitro*. Zu diesem Zweck musste einerseits ein Zellkulturmodell für die polarisierte Infektion etabliert werden und andererseits die notwendigen Reagenzien und initialen Daten über die Eigenschaften des UL43-Polypeptides des EHV-1 generiert werden. Die drei anderen bekannten multipel hydrophoben EHV-1-Proteine, gM, pUL20 und gK, waren dagegen bereits vor Beginn dieser Arbeit charakterisiert und entsprechende Deletionsmutanten standen zur Verfügung.

Da ein UL43-spezifisches Serum nicht gewonnen werden konnte, erfolgte die initiale strukturelle Charakterisierung des UL43-Produktes indirekt mit Hilfe eines Green Fluorescent Protein (GFP)-UL43-Fusionsproteins (GFPC43). Das von der Zelllinie TCGFPC43 exprimierte GFPC43 war membranassoziiert und wurde in extrazelluläre Virionen inkorporiert. Eine Lipid Raft-Assoziation konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe der TCGFPC43-Zellen konnte das Fluoreszenzmuster des GFPC43 unabhängig von der Infektion untersucht werden. GFPC43 kolokalisierte mit dem *trans*-Golgi Netzwerk (TGN)-Protein γ -Adaptin und nach Polarisation des Zellrasens zusätzlich mit dem Adherens Junctions (AJ)-Protein β -Catenin. Im TGN wird GFPC43 wahrscheinlich in reife Virionen inkorporiert. Die Ansammlung des GFPC43-Signals im Bereich der AJ dagegen ließ vermuten, dass das Protein eine Rolle beim direkten „Cell-to-Cell Spread“ spielen könnte.

Um die Funktion des pUL43 zu bestimmen, wurde eine UL43-Deletionsmutante generiert und diese auf ihre Wachstumseigenschaften in Zellkultur untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass (I) das pUL43 für die Replikation in Zellkultur nicht essentiell ist und (II) auch bei der Penetration in die Zellen keine Rolle spielt. (III) Die UL43-Deletion induzierte jedoch einen deutlichen Wachstumsnachteil, da intra- wie extrazelluläre Virustiter um bis zu 9,3fach reduziert waren. Eine noch auffälligere Rolle (IV) spielt pUL43 im „Cell-to-Cell Spread“. Die 25%ige Flächenreduktion der nach UL43-Deletion entstandenen Plaques konnte auf dichten TCGFPC43-Zellen auf 6 % vermindert werden.

Zur Etablierung eines Zellkulturmodells für die Infektion polarisierter Zellverbände wurden die Eigenschaften von Rk13- und MDCK-Zellen miteinander verglichen. Untersuchungen mit Polarisationsmarkern zeigten, dass Rk13-Zellen die für polarisierte Zellen charakteristischen Zellverbindungsstrukturen Tight Junctions (TJ) und AJ ausbilden konnten. Dichte Rk13-Zellverbände entwickelten außerdem konstant hohe, transepitheliale Widerstände und behinderten einen Flüssigkeitsaustausch zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment. Für Rk13-Zellen konnte dem zu Folge ein gewisser Grad an Polarisierbarkeit angenommen werden. Die MDCK-Zellen dagegen unterstützten die EHV-1-Replikation nur schlecht und wurden daher ausschließlich zu Vergleichszwecken herangezogen.

Die Bedeutung der multipel hydrophoben Proteine des EHV-1 in polarisierter Zellkultur wurde mit Hilfe des Transwell®-Filtersystems untersucht, da hier die Rk13-Zellen selektiv von apikal oder von basolateral infiziert werden konnten. In Vorversuchen wurde der am besten geeignete Auswertungszeitpunkt bestimmt. Über Unterschiede nach basolateraler Infektion mit den in den multipel hydrophoben Proteinen deletierten Viren H Δ 43, H Δ gM und L Δ 20 konnten leider keine eindeutigen Aussagen gemacht werden, da die ermittelten Titer insgesamt zu gering waren.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Experimente nach apikaler Infektion jedoch, dass die multipel hydrophoben Proteine des EHV-1 keine entscheidende Rolle im gerichteten „Egress“ spielen, obwohl sie wichtige Funktionen im „Cell-to-Cell Spread“ übernehmen.

Analysis of the influence of the multiply hydrophobic proteins of the equid herpesvirus 1 on the replication in polarized cells

Summary

The aim of this study was to analyse the putative roles of the equid herpesvirus 1 (EHV-1) multiply hydrophobic proteins in virus replication in polarized cells *in vitro*. To this end an *in vitro* model for infection of polarized cells had to be established. At the beginning of this study three out of four multiply hydrophobic EHV-1-proteins, gM, pUL20, and gK, had already been characterized and respective reagents were at disposal. The fourth predicted gene product, however, the UL43-protein, had to be identified and its function initially characterized.

As we were not able to raise UL43-specific antisera in rabbits, the structural properties of the UL43-product had to be assessed indirectly - using a green fluorescent protein (GFP)-UL43-fusionprotein. To this aim, a cell line constitutively expressing GFPC43 was isolated (TCGFPC43-cells) and GFPC43 shown to be associated with cellular membranes and to be incorporated into extracellular virions.

In TCGFPC43-cells the fluorescence pattern of the GFPC43 was analysed and shown to colocalize with the *trans*-golgi network (TGN)-protein γ -Adaptin and also with the adherens junctions (AJ)-protein β -Catenin. The latter colocalization was observed in very tight monolayers only. GFPC43 could be present in the area of the TGN to be incorporated into mature virions and the accumulation of the GFPC43-signal in close proximity to the AJ suggested that pUL43 might play a role in directed "cell-to-cell spread".

To examine the function of the pUL43, an UL43-negative virus was generated and its growth properties were analysed. It was shown, that (i) pUL43 is not essential for virus replication *in vitro* and (ii) that it does not play a role in virus penetration. Nevertheless, (iii) deleting UL43-sequences resulted in a decreased efficiency of replication, as resulting mutant virus titers were reduced by up to factor 9.3 in one step growth kinetics (intracellularly as well as extracellularly). Even more, pUL43 (iv) was shown to indeed be involved in "cell-to-cell spread", as after UL43-deletion a 25 % reduction of plaque areas was observed. This marked decrease in plaque sizes was clearly complemented on confluent TCGFPC43 cells.

To establish an *in vitro*-model for infection of polarized cells, respective properties of Rk13- and MDCK-cells were compared. Using markers of polarization it could be demonstrated that Rk13-cells are able to form the characteristic cell-contact-structures tight junctions (TJ) and AJ. In addition the transepithelial resistance and impermeability for liquids increased with confluency of monolayers. Rk13-cells were therefore assumed to be polarisable, at least to some extend. The efficiency of EHV-1-replication in MDCK-cells was only low and these cells therefore used for comparison in some experiments only.

The roles of the multiply hydrophobic proteins for EHV-1-replication in polarized Rk13-cells were then analysed using the Transwell®-filtersystem that allows to selectively infect cells from either apical or basolateral surfaces. Initial studies were designed to determine the ideal time point of analysis after infection. Taken together, virus titers after infecting basolateral surfaces were too low in this experimental setting to draw definite conclusions, but after infecting via apical surface it could be demonstrated that the multiply hydrophobic proteins of EHV-1 do not markedly influence the directionality of virus egress, albeit all these proteins play important roles in “cell-to-cell spread”.

7. Literaturverzeichnis

ABERLE, H., SCHWARTZ, H., UND KEMLER, R. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function, *Journal of Cellular Biochemistry* 61/4, 514-523

ALLEN, G.P., UND YEARGAN, M.R. 1987. Use of lambda gt11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glycoproteins of equine herpesvirus 1, *Journal of Virology* 61/8, 2454-2461

ALLEN, G.P., KYDD, J.H., SLATER, J.D., UND SMITH, K.C. 1999. Advances in Understanding of the Pathogenesis, Epidemiology and Immunological Control of Equine Herpesvirus Abortion, in: *Equine Infectious Diseases VIII*, Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai, 23rd-26th March 1998, R&W Publications (Newmarket) Limited

APODACA, G. 2001. Endocytic Traffic in Polarized Epithelial Cells: Role of the Actin and Microtubule Cytoskeleton, *Traffic* 2, 149-159

AVITABILE, E., LOMBARDI, G., GIANNI, T., CAPRI, M., UND CAMPADELLI-FIUME, G. 2004. Coexpression of UL20p and gK Inhibits Cell-Cell Fusion Mediated by Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD, gH-gL, and Wild-Type gB or an Endocytosis-Defective gB Mutant and Downmodulates Their Cell Surface Expression, *Journal of Virology* 78/15, 8015-8025

BAINES, J.D., WARD, P.L., CAMPADELLI-FIUME, G., UND ROIZMAN, B. 1991. The U_L20 Gene of Herpes Simplex Virus 1 Encodes a Function Necessary for Viral Egress, *Journal of Virology* 65/12, 6414-6424

BAINES, J.D., UND ROIZMAN, B. 1993. The U_L10 Gene of Herpes Simplex Virus 1 Encodes a Novel Viral Glycoprotein, gM, Which Is Present in the Virion and in the Plasma Membrane of Infected Cells, *Journal of Virology* 67/3, 1441-1452

BARMAN, S., ADHIKARY, L., KAWAOKA, Y., UND NAYAK, D.P. 2003. Influenza A Virus Hemagglutinin Containing Basolateral Localization Signal Does Not Alter the Apical Budding of a Recombinant Influenza A Virus in Polarized MDCK Cells, *Virology* 305, 138-152

BASAK, S., UND COMPANS, R.W. 1989. Polarized Entry of Canine Parvovirus in an Epithelial Cell Line, *Journal of Virology* 63/7, 3164-3167

BEN-ZE'EV, A., SHTUTMAN, M., UND ZHURINSKY, J. 2000. The Integration of Cell Adhesion with Gene Expression: The Role of β -Catenin, *Experimental Cell Research* 261, 75-82

CARTER, K.L., WARD, P.L., UND ROIZMAN, B. 1996. Characterization of the Products of the U_L43 Gene of Herpes Simplex Virus 1: Potential Implications for Regulations of Gene Expression by Antisense Transcription, *Journal of Virology* 70/11, 7663-7668

CEREIJIDO, M., VALDÉS, J., SHOSHANI, L., UND CONTRERAS, R.G. 1998. Role Of Tight Junctions In Establishing And Maintaining Cell Polarity, *Annual Review of Physiology* 60, 161-177

COOPER, G.M. 2000. The Cell: A Molecular Approach, Second Edition, ASM Press, Washington, D.C.

CRUMP, C.M., BRUUN, B., BELL, S., POMERANZ, L.E., MINSON, T., UND BROWNE, H.M. 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins, *Journal of General Virology* 85, 3517-3527

CSELLNER, H., WALKER, C., WELLINGTON, J.E., MCLURE, L.E., UND WHALLEY, J.M. 2000. EHV-1 Glycoprotein D (EHV-1 gD) Is Required for Virus Entry and Cell-Cell Fusion, and an EHV-1 gD Deletion Mutant Induces a Protective Immune Response in Mice, *Archives of Virology* 145, 2371-2385

DATSENKO, K.A., UND WANNER, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97/12, 6640-6645

DAVIS-POYNTER, N., BELL, S., MINSON, T., UND BROWNE, H. 1994. Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell-fusion, *Journal of Virology* 68/11, 7586-7590

DIETZ, P., KLUPP, B.G., FUCHS, W., KÖLLNER, B., WEILAND, E., UND METTENLEITER, T.C. 2000. Pseudorabies Virus Glycoprotein K Requires the UL20 Gene Product for Processing, *Journal of Virology* 74/11, 5083-5090

DINGWELL, K.S., UND JOHNSON, D.C. 1998. The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions, *Journal of Virology* 72/11, 8933-8942

- FANNING, A.S., MITIC, L.L., UND ANDERSON, J.M.** 1999. Transmembrane Proteins in the Tight Junction Barrier, *Journal of the American Society of Nephrology* 10, 1337-1345
- FARQUHAR, M.G., UND PALADE, G.E.** 1963. Junctional complexes in various epithelia, *The Journal of Cell Biology* 17, 375-412
- FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANIOFF, J., DESSELBERGER, U., UND BALL, L.A.** (eds.) 2005. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, *Academic Press*, San Diego, San Francisco, New York
- FEINBERG, A.P., UND VOGELSTEIN, B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Analytical Biochemistry* 132/1, 6-13
- FISH, K.N., BRITT, W., UND NELSON, J.A.** 1996. A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages, *Journal of Virology* 70/3, 1855-1862
- FÖLSCH, H.** 2005. The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells, *Trends in Cell Biology* 15/4, 222-228
- FOSTER, T.P., ALVAREZ, X., UND KOUSOULAS, K.G.** 2003. Plasma Membrane Topology of Syncytial Domains of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein K (gK): the UL20 Protein Enables Cell Surface Localization of gK but Not gK-Mediated Cell-to-Cell Fusion, *Journal of Virology* 77/1, 499-510
- FRIDAY, P.A., SCARRATT, W.K., ELVINGER, F., TIMONEY, P.J., UND BONDA, A.** 2000. Ataxia and Paresis with Equine Herpesvirus Type 1 Infection in a Herd of Riding School Horses, *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 197-201
- FURUSE, M., ITOH, M., HIRASE, T., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S., UND TSUKITA, S.** 1994. Direct Association of Occludin with ZO-1 and Its Possible Involvement in the Localization of Occludin at Tight Junctions, *The Journal of Cell Biology* 127/6, 1617-1626
- GERAGHTY, R.J., KRUMMENACHER, C., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J., UND SPEAR, P.G.** 1998. Entry of Alphaherpesviruses Mediated by Poliovirus Receptor-Related Protein 1 and Poliovirus Receptor, *Science* 280, 1618-1620

GERRARD, S.R., ROLLIN, P.E., UND NICHOL, S.T. 2002. Bidirectional Infection and Release of Rift Valley Fever Virus in Polarized Epithelial Cells, *Virology* 301, 226-235

GONZÁLEZ-MARISCAL, L., BETANZOS, A., UND ÁVILA-FLORES, A. 2000. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction, *Cell & Developmental Biology* 11, 315-324

GOODING, J.M., YAP, K.L., UND IKURA, M. 2004. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures, *BioEssays* 26, 497-511

GRANZOW, H., WEILAND, F., JÖNS, A., KLUPP, B.G., KARGER, A., UND METTENLEITER, T.C. 1997. Ultrastructural Analysis of the Replication Cycle of Pseudorabies Virus in Cell Culture: a Reassessment, *Journal of Virology* 71/3, 2072-2082

GRANZOW, H., KLUPP, B.G., FUCHS, W., VEITS, J., OSTERRIEDER, N., UND METTENLEITER, T.C. 2001. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study, *Journal of Virology* 75/8, 3675-3684

GUGGEMOOS, S. 2004. Untersuchungen zur Struktur und Funktion der UL11- und UL20-Proteine des equinen Herpesvirus Typ 1, *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

GUGGEMOOS, S., JUST, F.T., UND NEUBAUER, A. The equine herpesvirus 1 UL20 product physically interacts with glycoprotein K and promotes egress of mature particles, *im Druck*

HARHAJ, N.S., UND ANTONETTI, D.A. 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1206-1237

HASKINS, J., GU, L., WITTCHEN, E.S., HIBBARD, J., UND STEVENSON, B.R. 1998. ZO-3, a Novel Member of the MAGUK Protein Family Found at the Tight Junction, Interacts with ZO-1 and Occludin, *The Journal of Cell Biology* 141/1, 199-208

HAYASHI, K. 1995. Role of Tight Junctions of Polarized Epithelial MDCK Cells in the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1, *Journal of Medical Virology* 47, 323-329

- HUBERT, P.H., BIRKENMAIER, S., RZIHA, H.J., UND OSTERRIEDER, N.** 1996. Alterations in the equine herpesvirus type-1 (EHV-1) strain Rach during attenuation, *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, Reihe B, 1-14
- HUTCHINSON, L., GOLDSMITH, K., SNODDY, D., GHOSH, H., GRAHAM, F.L., UND JOHNSON, D.C.** 1992. Identification and Characterization of a Novel Herpes Simplex Virus Glycoprotein, gK, Involved in Cell Fusion, *Journal of Virology* 66/9, 5603-5609
- IKONEN, E., UND SIMONS, K.** 1998. Protein and lipid sorting from the *trans*-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells, *Cell & Developmental Biology* 9, 503-509
- JÖNS, A., DIJKSTRA, J.M., UND METTENLEITER, T.C.** 1998. Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex, *Journal of Virology* 72, 550-557
- JOHANNSEN, E., LUFTIG, M., CHASE, M.R., WEICKSEL, S., CAHIR-MCFARLAND, E., ILLANES, D., SARRACINO, D., UND KIEFF, E.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus, *PNAS* 101/46, 16286-16291
- JOHNSON, D.C., UND FEENSTRA, V.** 1987. Identification of a Novel Herpes Simplex Virus Type 1-Induced Glycoprotein Which Complexes with gE and Binds Immunoglobulin, *Journal of Virology* 61/7, 2208-2216
- JOHNSON, D.C., WEBB, M., WISNER, T.W., UND BRUNETTI, C.** 2001. Herpes Simplex Virus gE/gI Sorts Nascent Virions to Epithelial Cell Junctions, Promoting Virus Spread, *Journal of Virology* 75/2, 821-833
- JOHNSON, D.C., UND HUBER, M.T.** 2002. Directed Egress of Animal Viruses Promotes Cell-to-Cell Spread, *Journal of Virology* 76/1, 1-8
- KLUPP, B.G., NIXDORF, R., UND METTENLEITER, T.C.** 2000. Pseudorabies Virus Glycoprotein M Inhibits Membrane Fusion, *Journal of Virology* 74/15, 6760-6768
- KLUPP, B.G., ALTENSCHMIDT, J., GRANZOW, H., FUCHS, W., UND METTENLEITER, T.C.** 2005. Identification and characterization of the pseudorabies virus UL43 protein, *Virology* 334, 224-233
- KLYMKOWSKY, M.W.** 2005. β -catenin and its regulatory network, *Human Pathology* 36, 225-227

- KOJIMA, T., SPRAY, D.C., KOKAI, Y., CHIBA, H., MOCHIZUKI, Y., UND SAWADA, N.** 2002. Cx32 Formation and/or Cx32-Mediated Intercellular Communication Induces Expression and Function of Tight Junctions in Hepatocytic Cell Line, *Experimental Cell Research* 276, 40-51
- KYTE, J., UND DOOLITTLE, R.F.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of Molecular Biology* 157, 105-132
- LAKE, C.M., MOLESWORTH, S.J., UND HUTT-FLETCHER, L.M.** 1998. The Epstein-Barr Virus (EBV) gN Homolog BLRF1 Encodes a 15-Kilodalton Glycoprotein That Cannot Be Authentically Processed unless It Is Coexpressed with the EBV gM Homolog BBRF3, *Journal of Virology* 72/7, 5559-5564
- LEWIN, B.** 1998. Molekularbiologie der Gene, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin
- LIU, F., UND ROIZMAN, B.** 1991. The Promoter, Transcriptional Unit, and Coding Sequence of Herpes Simplex Virus 1 Family 35 Proteins Are Contained within and in Frame with the U_L26 Open Reading Frame, *Journal of Virology* 65/1, 206-212
- MABIT, H., NAKANO, M.Y., PRANK, U., SAAM, B., DÖHNER, K., SODEIK, B., UND GREBER, U.F.** 2002. Intact Microtubules Support Adenovirus and Herpes Simplex Virus Infections, *Journal of Virology* 76/19, 9962-9971
- MACH, M., KROPFF, B., DAL MONTE, P., UND BRITT, W.** 2000. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73), *Journal of Virology* 74/24, 11881-11892
- MACLEAN, C.A., EFSTATHIOU, S., ELLIOTT, M.L., JAMIESON, F.E., UND MCGEOCH, D.J.** 1991. Investigation of herpes simplex virus type 1 genes encoding multiply inserted membrane proteins, *Journal of General Virology* 72, 897-906
- MAIDJI, E., TUGIZOV, S., JONES, T., ZHENG, Z., UND PEREIRA, L.** 1996. Accessory Human Cytomegalovirus Glycoprotein US9 in the Unique Short Component of the Viral Genome Promotes Cell-to-Cell Transmission of Virus in Polarized Epithelial Cells, *Journal of Virology* 70/12, 8402-8410

- MAROZIN, S., PRANK, U., UND SODEIK, B.** 2004. Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites, *Journal of General Virology* 85, 775-786
- MAYR, A., PETTE, J., PETZOLDT, K., UND WAGENER, K.** 1968. Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde, *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*, 406-418
- McMILLAN, T.N., UND JOHNSON, D.C.** 2001. Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus gE Causes Accumulation in the *trans*-Golgi Network, a Site of Virus Envelopment and Sorting of Virions to Cell Junctions, *Journal of Virology* 75/4, 1928-1940
- MEYER, H., UND HUBERT, P.H.** 1988. Isolation and characterization of monoclonal antibodies against an attenuated vaccine strain of equine herpesvirus type 1 (EHV-1), *Veterinary Microbiology* 18/1, 95-101
- MODROW, S., HOFLACHER, B., UND WOLF, H.** 1992. Identification of a protein encoded in the EB-viral open reading frame BMRF2, *Archives of Virology* 127, 379-386
- MOSTOV, K.E., VERGES, M., UND ALTSCHULER, Y.** 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells, *Current Opinion in Cell Biology* 12, 483-490
- MOSTOV, K.E., SU, T., UND TER BEEST, M.** 2003. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity, *Review, Nature Cell Biology* 5, 287-293
- NEUBAUER, A., BRAUN, B., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R., UND OSTERRIEDER, N.** 1997. Analysis of the Contributions of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gB Homolog to Virus Entry and Direct Cell-to-Cell-Spread, *Virology* 227, 281-294
- NEUBAUER, A., BEER, M., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R., UND OSTERRIEDER, N.** 1997a. Equine Herpesvirus 1 Mutants Devoid of Glycoprotein B or M Are Apathogenic for Mice but Induce Protection against Challenge Infection, *Virology* 239, 36-45
- NEUBAUER, A., RUDOLPH, J., BRANDMÜLLER, C., JUST, F.T., UND OSTERRIEDER, N.** 2002. The Equine Herpesvirus 1 UL34 Gene Product Is Involved in an Early Step in Virus Egress and Can Be Efficiently Replaced by a UL34-GFP Fusion Protein, *Virology* 300, 189-204

- NEUBAUER, A., UND OSTERRIEDER, N.** 2004. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress, *Virology* 329, 18-32
- NUSRAT, A., PARKOS, C.A., FOLEY, C.S., LIANG, T.W., INNIS-WHITEHOUSE, W., EASTBURN, K.K., UND MADARA, J.L.** 2000. Tight junctions are membrane microdomains, *Journal of Cell Science* 113, 1771-1781
- OETTLER, D., KAADEN, O.-R., UND NEUBAUER, A.** 2001. The Equine Herpesvirus 1 UL45 Homolog Encodes a Glycosylated Type II Transmembrane Protein and Is Involved in Virus Egress, *Virology* 279, 302-312
- OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., BRANDMÜLLER, C., BRAUN, B., KAADEN, O.-R., UND BAINES, J.D.** 1996. The Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gp21/22a, the Herpes Simplex Virus Type 1 gM Homolog, Is Involved in Virus Penetration and Cell-to-Cell Spread of Virions, *Journal of Virology* 70/6, 4110-4115
- OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., FAKLER, B., BRANDMÜLLER, C., SEYBOLDT, C., KAADEN, O.-R., UND BAINES, J.D.** 1997. Synthesis and Processing of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein M, *Virology* 232, 230-239
- OSTERRIEDER, N.** 1999. Construction and Characterization of an Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein C Negative Mutant, *Virus Research* 59, 165-177
- PERTEL, P.E., FRIDBERG, A., PARISH, M.L., UND SPEAR, P.G.** 2001. Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Glycoproteins gB, gD, and gH-gL Requires a gD Receptor but Not Necessarily Heparan Sulfate, *Virology* 279, 313-324
- PLOUBIDOU, A., MOREAU, V., ASHMAN, K., RECKMANN, I., GONZALEZ, C., UND WAY, M.** 2000. Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function, *The EMBO Journal* 19/15, 3932-3944
- POWERS, L., WILKINSON, K.S., UND RYAN, P.** 1994. Characterization of the prv43 Gene of Pseudorabies Virus and Demonstration That It Is Not Required for Virus Growth in Cell Culture, *Virology* 199, 81-88

- PRYDZ, K., BRANDLI, A.W., BOMSEL, M., UND SIMONS, K.** 1990. Surface distribution of the mannose 6-phosphate receptors in epithelial Madin-Darby canine kidney cells, *The Journal of Biological Chemistry* 265, 12629-12635
- RAJCANI, J., VOJVODOVA, A., UND REZUCHOVA, I.** 2004. Peculiarities of Herpes Simplex Virus (HSV) Transcription: An overview, *Virus Genes* 28:3, 293-310
- RODRIGUEZ, D., RODRIGUEZ, J.-R., OJAKIAN, G.K., UND ESTEBAN, M.** 1991. Vaccinia Virus Preferentially Enters Polarized Epithelial Cells through the Basolateral Surface, *Journal of Virology* 65/1, 494-498
- ROIZMAN, B., UND KNIPE, D.M.** 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, in: Knipe, D.M., Howley, M.D. (eds.), *Fields Virology*, 4th ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- ROIZMAN, B., UND PELLETT, P.E.** 2001. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction, in: Knipe, D.M., Howley, M.D. (eds.), *Fields Virology*, 4th ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- ROSSEN, J.W.A., HORZINEK, M.C., UND ROTTIER, P.J.M.** 1995. Coronavirus infection of polarized epithelial cells, *Trends in Microbiology* 3/12, 486-490
- ROTHEN-RUTISHAUSER, B., RIESEN, F.K., BRAUN, A., GÜNTHER, M., UND WUNDERLI-AlLENSPACH, H.** 2002. Dynamics of Tight and Adherens Junctions Under EGTA Treatment, *The Journal of Membrane Biology* 188, 151-162
- RUDOLPH, J., UND OSTERRIEDER, N.** 2002. Equine Herpesvirus Type 1 Devoid of gM and gp2 Is Severely Impaired in Virus Egress but Not Direct Cell-to-Cell Spread, *Virology* 293, 356-367
- RUDOLPH, J., SEYBOLDT, C., GRANZOW, H., UND OSTERRIEDER, N.** 2002. The Gene 10 (UL49.5) Product of Equine Herpesvirus 1 Is Necessary and Sufficient for Functional Processing of Glycoprotein M, *Journal of Virology* 76/6, 1-12
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., UND ERLICH, H.A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-491

SAMBROOK, J., UND RUSSEL, D.W. (eds.) 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York

SCHELHAAS, M., JANSEN, M., HAASE, I., UND KNEBEL-MÖRSDORF, D. 2003. Herpes simplex virus type 1 exhibits a tropism for basal entry in polarized epithelial cells, *Journal of General Virology* 84, 2473-2484

SCHIMMER, C., UND NEUBAUER, A. 2003. The Equine Herpesvirus 1 UL11 Gene Product Localizes to the Trans-Golgi Network and Is Involved in Cell-to-Cell-Spread, *Virology* 308, 23-36

SEARS, A.E., MC GWIRE, B.S., UND ROIZMAN, B. 1991. Infection of polarized MDCK cells with herpes simplex virus 1: Two asymmetrically distributed cell receptors interact with different viral proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5087-5091

SEYBOLDT, C., GRANZOW, H., UND OSTERRIEDER, N. 2000. Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Glycoprotein M: Effect of Deletions of Transmembrane Domains, *Virology* 278, 477-489

SHAPIRO, L. 2001. β -catenin and its multiple partners: promiscuity explained, *Nature Structural Biology* 8/6, 484-487

SHEFF, D.R., DARO, E.A., HULL, M., UND MELLMAN, I. 1999. The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions, *The Journal of Cell Biology* 145/1, 123-139

SHIEH, M.-T., UND SPEAR, P.G. 1994. Herpesvirus-Induced Cell Fusion That Is Dependent on Cell Surface Heparan Sulfate or Soluble Heparin, *Journal of Virology* 68/2, 1224-1228

SIMONS, K., UND FULLER, S.D. 1985. Cell Surface Polarity in Epithelia, *Ann. Rev. Cell Biol.* 1, 243-288

SODEIK, B., EBERSOLD, M.W., UND HELENIUS, A. 1997. Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus, *The Journal of Cell Biology* 136/5, 1007-1021

SPEAR, P.G. 1993. Membrane fusion induced by herpes simplex virus, J. Bentz (ed.), *Viral fusion mechanisms*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 201-232

SPEAR, P.G., EISENBERG, R.J., UND COHEN, G.H. 2000. Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry, *Virology* 275, 1-8

SPEAR, P.G., UND LONGNECKER, R. 2003. Herpesvirus Entry: an Update, *Journal of Virology* 77/19, 10179-10185

STIERSTORFER, B., EICHHORN, W., SCHMAHL, W., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R., UND NEUBAUER, A. 2002. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Myeloencephalopathy: a Case Report, *The Journal of Veterinarian Medicine* B 49, 37-41

TELFORD, E.A.R., WATSON, M.S., MCBRIDE, K., UND DAVISON, A.J. 1992. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1, *Virology* 189, 304-316

TISCHER, B.K., SCHUMACHER, D., MESSERLE, M., WAGNER, M., UND OSTERRIEDER, N. 2002. The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells, *Journal of General Virology* 83, 997-1003

TOPP, K.S., ROTHMAN, A.L., UND LAVAIL, J.H. 1997. Herpes Virus Infection of RPE and MDCK Cells: Polarity of Infection, *Experimental Eye Research*, 343-354

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., UND GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76/9, 4350-4354

TRAN, L.C., KISSNER, J.M., WESTERMAN, L.E., UND SEARS, A.E. 2000. A herpes simplex virus 1 recombinant lacking the glycoprotein G coding sequences is defective in entry through apical surfaces of polarized epithelial cells in culture an *in vivo*, *PNAS* 97/4, 1818-1822

TUCKER, S.P., THORNTON, C.L., WIMMER, E., UND COMPANS, R.W. 1993. Bidirectional Entry of Poliovirus into Polarized Epithelial Cells, *Journal of Virology* 67/1, 29-38

TUGIZOV, S.M., BERLINE, J.W., UND PALEFSKY, J.M. 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells, *Nature Medicine* 9, 307-314

VAN MAANEN, C. 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update, *The Veterinary Quarterly* 24, 58-78

- WARD, P.L., CAMPADELLI-FIUME, G., AVITABILE, E., UND ROIZMAN, B.** 1994. Localization and Putative Function of the U_L20 Membrane Protein in Cells Infected with Herpes Simplex Virus 1, *Journal of Virology* 68/11, 7406-7417
- WARD, P.L., BARKER, D.E., UND ROIZMAN, B.** 1996. A Novel Herpes Simplex Virus 1 Gene, U_L43.5, Maps Antisense to the U_L43 Gene and Encodes a Protein Which Colocalizes in Nuclear Structures with Capsid Proteins, *Journal of Virology* 70/5, 2684-2690
- WEIMBS, T., LOW, S.H., CHAPIN, S.J., UND MOSTOV, K.E.** 1997. Apical targeting in polarized epithelial cells: there's more afloat than rafts, *Trends in Cell Biology* 7, 393-399
- WISNER, T., BRUNETTI, C., DINGWELL, K., UND JOHNSON, D.C.** 2000. The Extracellular Domain of Herpes Simplex Virus gE Is Sufficient for Accumulation at Cell Junctions but Not for Cell-to-Cell Spread, *Journal of Virology* 74/5, 2278-2287
- WU, S.X., ZHU, X.P., UND LETCHWORTH, G.J.** 1998. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein, *Journal of Virology* 72/4, 3029-3036
- YEAMAN, C., GRINDSTAFF, K.K., UND NELSON, W.J.** 1999. New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity, *Physiological Reviews* 79/1, 73-90
- ZIEGLER, C.** 2002. Untersuchungen über die Eignung der Equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4 als Vektorvakzine, *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- ZIMMER, G., ZIMMER, K.-P., TROTZ, I., UND HERRLER, G.** 2002. Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Does Not Determine the Site of Virus Release in Polarized Epithelial Cells, *Journal of Virology* 76/8, 4103-4107

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junctions
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BAC	„bacterial artificial chromosome“
BHV-1 (-5)	Trivialabkürzung des Bovinen Herpesvirus 1 (-5) Offizielle Abkürzung: BoHV-1 (-5)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-	an Kohlenstoff gebunden
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 4 (Epstein-Barr Virus) Offizielle Abkürzung: HHV-4
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EHV-1	Equides Herpesvirus 1
ENS	embryonale Schweinenierenzellen
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere Autoren
evtl.	eventuell
F	Farad
Fa.	Firma
FRT	FLP-recognition target
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
g(p)	Glykoprotein
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde

HCMV	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 5 (Humanes Cytomegalovirus) Offizielle Abkürzung: HHV-5
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
HSV-1	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 1 (Herpes Simplex Virus 1) Offizielle Abkürzung: HHV-1
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IR	“Internal Repeat”-Region
JAM	Junctional Adhesion Molecules
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KyA	KentuckyA-Stamm
l	Liter
m	milli-
M	molar
MAk	monoklonaler Antikörper
mbar	Millibar
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney-Zelllinie
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
N	normal
N-	an Stickstoff gebunden
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O-	an Sauerstoff gebunden
OD _x	optische Dichte bei x nm Wellenlänge gemessen
OH-	an Hydroxylgruppe gebunden
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
p	Protein von
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbE	Plaque-bildende Einheiten
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentia hydrogenium
p. i.	post infectionem
POD	Peroxidase
PRV	Trivialabkürzung des Suiden Herpesvirus 1 (Pseudorabies Virus) Offizielle Abkürzung: SuHV-1
Rk13	Rabbit Kidney-Zelllinie

rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RVFV	Rift Valley Fever Virus (Rifttalfieber-Virus)
s.	siehe
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TJ	Tight Junctions
TR	„Terminal Repeat“-Region
U	Unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	ÜN-Kultur
U _L	“Unique Long“-Region
U _S	“Unique Short“-Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VZV	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster Virus) Offizielle Abkürzung: HHV-3
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
z. B.	zum Beispiel
ZO	zonula occludens
zpE	zytopathischer Effekt
z. T.	zum Teil
μ	Mikro

Danksagung

Im Gedenken an Herrn Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden, der mir den Arbeitsplatz zur Verfügung stellte, mir die Wahl des Themas überließ und mir stets seine Unterstützung gewährte.

Vielen Dank für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität" und an dessen Leiter Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann.

Frau Dr. Antonie Neubauer gebührt an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön für die hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit. Für die freundliche und liebenswerte Unterstützung und ihr immerwährendes Verständnis möchte ich mich vielmals bei ihr bedanken.

Bei Frau Christine Brandmüller bedanke ich mich für die geduldige Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, die stets freundliche Unterstützung bei labortechnischen Fragen und die gute Zusammenarbeit. Vielen Dank auch allen anderen Kollegen des Instituts für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Danielle Pruy, Frau Dr. Simone Guggemoos und Frau Dr. Judith Kießling, die mir in allen Belangen eine große Hilfe waren, möchte ich mich auf diesem Wege ganz herzlich bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während meines beruflichen Werdeganges. Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, Karin und Wilfried Stenke, die mir das Studium ermöglicht haben und mich während der ganzen Zeit stets liebevoll unterstützt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Mann Stefan für sein Verständnis und die geduldige und liebevolle Unterstützung während meines Studiums und der Promotion bedanken.